

Université Paris Descartes

Ecole doctorale Biologie et Biotechnologie

INSERM U1016 Institut Cochin / Equipe Neutrophiles et Vascularites

**Rôle pro-inflammatoire et
immunomodulateur de la proteinase 3
membranaire exprimée au cours de
l'apoptose**
Implications dans la granulomatose avec polyangéite

Par Arnaud Millet

Thèse de doctorat de Biologie et Biotechnologie

Dirigée par Véronique Witko-Sarsat

Présentée et soutenue publiquement le 15 Janvier 2014

Devant un jury composé de :

Loïc GUILLEVIN, Professeur, Président du Jury

Renato MONTEIRO, Professeur, Rapporteur

Philippe SAAS, Professeur, Rapporteur

Nathalie THIEBLEMONT, Chargée de Recherche, Invitée

Véronique WITKO-SARSAT, Directeur de Recherche, Directrice de thèse

Remerciements

Je remercie le professeur Loïc Guillevin de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Je remercie le professeur Renato Monteiro qui a très gentiment accepté de devenir rapporteur de ce travail.

Je remercie le professeur Philippe Saas qui m'a fait l'amitié d'accepter d'être rapporteur de cette thèse et pour les discussions toujours très agréables que nous avons eu ensemble.

Je remercie de docteur Nathalie Thieblemont d'avoir accepté d'examiner ce travail malgré les affres des statuts administratifs qui l'empêche d'être officiellement examinatrice.

Je remercie le docteur Véronique Witko-Sarsat d'avoir accepté de diriger cette thèse, de m'avoir accepté dans son laboratoire et de m'avoir initié au monde de la protéinase 3. Je la remercie vivement de m'avoir donné l'opportunité de pouvoir aller à la « Gordon Conference » sur la clairance des cellules apoptotiques au début de ma thèse, cette semaine aura été un tournant scientifique pour moi ce que je n'oublierai pas.

Je remercie le professeur Luc Mouthon (co-directeur du groupe) qui est à l'origine de ma venue sur Cochin à la suite d'une discussion que nous avons eu à Ajaccio puis à Florence.

Je remercie Julie et Céline qui sont les piliers du laboratoire qui m'ont permis rapidement de me sentir chez moi dans le labo et pour leur soutien. Et je remercie particulièrement Julie pour son aide sur le sujet PR3.

Je remercie le docteur Sylvain Perruche qui m'a permis de venir travailler dans son équipe à Besançon à un moment clé de ma thèse et qui m'a initié à la biologie des cellules dendritiques plasmacytoïdes. Je remercie toute l'équipe de Besançon pour son accueil chaleureux et particulièrement Francis qui a gentiment accepté de me montrer les différentes astuces permettant de faire une co-culture pDC-T réussie. Je remercie Sandra de m'avoir hébergé. Je garde un souvenir un peu perplexe des spécialités antillo-franc-comtoises...

Je remercie le docteur Amiram Ariel (Haïfa, Israël) pour nos discussions toujours très enrichissantes.

Je remercie les membres du laboratoire pour les discussions que nous avons pu avoir au cours de ces trois ans : Alessia, Alexis, Aurélie, Constance, Magali, Matthieu Groh, Matthieu Tamby, Nicolas, Sébastien. Je remercie Alessia d'avoir supporté mes blagues sur les italiens... et je garderai un souvenir amusé de ce jour de juillet 2013 où Aurélie, Matthieu et Sébastien se sont battus avec moi dans les escaliers pour sauver ce qu'il y avait dans notre -80°...

Je salue les nouveaux venus dans le laboratoire : Delphine, Katherine et Nicolas.

Je remercie le docteur Aminata Touré, ma tutrice à l'institut, pour sa gentillesse et sa sagesse qui m'ont beaucoup aidé.

Je remercie les personnes suivantes pour les discussions informelles plaisantes que nous avons eues ensemble à l'institut Cochin et pour leur aide : Alain Trautman, Michael Valente, Vincent Feuillet, Arnaud Delpoux, Armelle Blondel, Evelyne Lauret, Georges Bismuth, Florence Niedergang, Sandrine Bourdoulous.

Je remercie les personnes suivantes des plateformes de l'institut pour leur disponibilité et leur gentillesse : Muriel Andrieu (CYBIO), Karine Labroquière (CYBIO), Pierre Bourdoncle (Imagerie), Thomas Guilbert (Imagerie), Béatrice Durel (Imagerie).

Je remercie mes anciens collègues rennais qui m'ont soutenu dans mon choix : le professeur Patrick Jegou, le docteur Claire Cazalets, le docteur Olivier Decaux, le docteur Matthieu Revest et le docteur Pierre Gueret. J'ai beaucoup appris à leur contact et si je garde une petite partie de clinique en moi c'est grâce à eux. Leur amitié m'honore.

Je remercie ma famille, mon père, ma mère et mon frère pour leur soutien.

Mais je remercie surtout ma femme, Sylvie, et mes deux filles, Manon et Emma, sans qui tout ceci n'aurait tout simplement pas de sens...

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	4
---------------------------	----------

PARTIE I : PROCESSUS INFLAMMATOIRE	5
---	----------

1. L'INFLAMMATION. DEFINITION	5
2. APPROCHE SEQUENTIELLE DU PROCESSUS INFLAMMATOIRE	5
2.1 <i>Un processus régulé</i>	6
2.2 <i>Initiation : sources exogènes et endogènes</i>	7
2.2.1. Sources exogènes.....	7
2.2.2. Sources endogènes	8
2.3. <i>Les récepteurs de signaux dangers</i>	9
2.4. <i>Les médiateurs</i>	14
2.5 <i>Les effecteurs cellulaires</i>	17
2.5.1 L'extravasation des neutrophiles	20
2.5.2. Devenir du neutrophile après extravasation	23
2.5.3. Les neutrophiles attirent les monocytes.....	24
2.6. <i>Initiation de la résolution</i>	25
2.6.1. Modification des médiateurs lipidiques.....	26
2.6.2. Signaux pro-résolutifs	27
2.6.3 Inactivation des chimiokines.....	28
2.7 <i>Vie et mort du neutrophile</i>	28
2.8. <i>Restauration de l'homéostasie</i>	35

PARTIE II : CLAIRANCE DES CELLULES APOPTOTIQUES	37
--	-----------

1. LES DIFFERENTES PHASES	37
1.1 <i>Etape 1 : Signaux "Find me"</i>	38
1.2 <i>Etape 2 Signaux « Eat me »</i>	40
1.3 <i>Phase 3 Phagocytose</i>	44
1.4 <i>Etape 4 Maturation du phagosome : « clear me »</i>	45
2. REPROGRAMMATION DU MACROPHAGE DURANT L'EFFEROCTOSE	47
2.1. <i>Les macrophages un groupe cellulaire hétérogène</i>	47
2.2. <i>Origine des macrophages</i>	48
2.3. <i>Polarisation du macrophage</i>	51
2.4. <i>Changement de programme durant l'efferocytose</i>	54
3. EFFET IMMUNOMODULATEUR DE LA CLAIRANCE DES CELLULES APOPTOTIQUES	56

PARTIE III : CONTEXTE DU TRAVAIL	59
---	-----------

1. ARTICLE 1 : LA PHYSIOPATHOLOGIE DES VASCULARITES A ANCA	59
ARTICLE 1.....	60
2. ARTICLE 2 : LES VASCULARITES A ANCA ; EST-IL TEMPS DE SEPARER LE GROUPE ?	61
ARTICLE 2.....	62
3. LES SERINES PROTEASES DU NEUTROPHILE	63
3.1. <i>Les granules du neutrophile</i>	64
3.2. <i>Biologie des sérines protéases du neutrophile</i>	64

3.3. La protéinase 3 une sérine protéase aux propriétés singulières.....	67
3.3.1. Aspects structuraux	67
3.3.2. Rôle dans la différenciation myéloïde.....	69
3.3.3. PR3 et inflammation	70
3.3.4. Les inhibiteurs de la PR3	71
3.3.5. La PR3 murine	72
RESULTATS	74
PARTIE IV : INSERTION MEMBRANAIRE DE LA PR3 - MECANISMES ET FONCTIONS	75
1. EXISTENCE D'UN PATCH HYDROPHOBE PERMETTANT L'ANCRAGE MEMBRANAIRE DE LA PR3 : CONSEQUENCES FONCTIONNELLES	75
2. LE MODELE CELLULAIRE RBL	75
3. ARTICLE 3 : ANALYSE MOLECULAIRE DE L'INSERTION MEMBRANAIRE DE LA PROTEINASE 3, L'AUTO-ANTIGENE DE LA MALADIE DE WEGENER, DANS LES CELLULES RBL : IMPLICATIONS SUR SON ACTIVITE PATHOGENIQUE	77
ARTICLE 3.....	78
1. ARTICLE 4 : LA PROTEINASE 3, L'AUTO-ANTIGENE DE LA GRANULOMATOSE AVEC POLYANGEITE, S'ASSOCIE AVEC LA CALRETICULINE A LA SURFACE DES NEUTROPHILES APOPTOTIQUES, PERTURBE LEUR PHAGOCYTOSE PAR LES MACROPHAGES ET FAVORISE L'INFLAMMATION	79
ARTICLE 4.....	80
2. RESULTATS COMPLEMENTAIRES	81
2.1 Interaction entre CD177 et PR3	81
2.2 Expression de la PR3 après apoptose induite par ultraviolet	82
2.3 Impact de l'expression de la PR3 sur la captation des cellules apoptotiques	83
2.4 Cinétique en temps réel de la captation des cellules apoptotiques	84
PARTIE VI : IMPACT DE LA PR3 SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE	89
1. INTRODUCTION	89
1.1 Origine et identification des cellules dendritiques plasmacytoïdes	89
1.2 Fonctions immunes des cellules dendritiques plasmacytoïdes	90
1.3 Développement des lymphocytes T et cellules dendritiques plasmacytoïdes.....	91
1.4 Clairance des cellules apoptotiques et cellules dendritiques plasmacytoïdes	91
2. ARTICLE 5 : LA PROTEINASE 3, AUTO-ANTIGENE CIBLE DE LA GRANULOMATOSE AVEC POLYANGEITE, INTERFERE AVEC LA RESOLUTION DE L'INFLAMMATION ET AMPLIFIE SA PROPRE EXPRESSION	92
ARTICLE 5.....	93
3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES	94
3.1 Recrutement d'éosinophiles au cours d'une péritonite au thioglycollate.....	94
3.2 Etude des facteurs de transcription des lymphocytes T.....	95
3.3 Profil de sécrétion des cellules dendritiques plasmacytoïdes exposées au surnageant des macrophages	96
3.4 Etude des cellules dendritiques « classiques » CD11c ⁺	97
PARTIE VII : MONOCYTES/MACROPHAGES ET PR3	100
1. MONOCYTES	100
1.1 Différentes populations de monocytes	100
1.2 Expression de PR3 et monocytes	103

2. MACROPHAGES	104
2.1 Différenciation des macrophages <i>in vitro</i>	104
2.2 Expression de la PR3 et macrophages	105
 CONCLUSIONS & PERSPECTIVES.....	108
 PARTIE VIII : CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	109
1. RESULTATS OBTENUS.....	109
2. EXTENSION A UN MODELE <i>IN VIVO</i>	111
3. MACROPHAGES ET PROTEINASE 3	114
4. QUESTIONS SOULEVEES PAR LA PHAGOCYTOSE DES CELLULES APOPTOTIQUES.....	116
5. APPROCHES THERAPEUTIQUES.....	119
 BIBLIOGRAPHIE	120

INTRODUCTION

PARTIE I : Processus inflammatoire

1. L'inflammation. Définition

Dans le langage médical usuel l'inflammation est une notion sémiologique rattachée à des manifestations cliniques dont la description initiale remonte à Celsus il y a 2000 ans. L'association d'une rougeur, d'un œdème, d'une augmentation locale de température et d'une douleur auxquelles Virchow au XIX^{ème} siècle a rajouté l'impotence fonctionnelle définissent ce syndrome. Si la pratique clinique a consacré cette notion, ses limitations théoriques sont évidentes ne serait ce que parce qu'elle se limite à ce qui peut être vu ou touché par le clinicien. Nous utiliserons une définition plus générale et fonctionnelle : l'inflammation est le processus de réponse d'un organisme à une rupture de l'homéostasie d'un tissu suffisamment sévère pour que les capacités homéostatiques du tissu soient insuffisantes à rétablir l'équilibre. Ce mécanisme est un trait adaptatif commun aux vertébrés et invertébrés. Il implique le recrutement de composants du sang que ce soit des protéines plasmatiques ou des leucocytes sur le site atteint chez les mammifères. Ce mécanisme de défense peut être activé par une infection bactérienne aussi bien que par un traumatisme. D'un point de vue évolutif la proximité fonctionnelle de ces deux déclencheurs n'est probablement pas due au hasard. Une plaie cutanée est une porte d'entrée infectieuse nécessitant une réponse rapide dans l'hypothèse de la présence de germes pathogènes (Nathan 2002). Les dommages cellulaires dans les deux cas ouvrent la porte à un schéma explicatif que nous allons maintenant détailler.

2. Approche séquentielle du processus inflammatoire

L'inflammation est un processus de réponse contrôlée dont l'objectif est la réparation et la régénération d'un tissu lésé par une agression dépassant les capacités de réponse normale du tissu. L'ensemble des éléments participant à cette réponse forme un système complexe, multi-échelle, interconnecté dont la réponse est normalement proportionnée à l'agression ayant une évolution temporelle dépendant de l'histoire de l'organisme comprenant de multiples boucles de rétroaction positives ou négatives. Une des caractéristiques de ce système est sa robustesse permettant le retour à un état proche de l'état basal malgré la diversité des altérations possibles du tissu cible. Savoir si cette robustesse est liée à la

compartimentation de ce système en réseaux géniques, cellulaires, tissulaires ou entre organismes ou populations est un enjeu majeur de l'étude de l'inflammation. L'évolution temporelle d'une réponse inflammatoire est classiquement représentée par une courbe présentant une phase de croissance rapide suivie d'un plateau et enfin d'une décroissance (figure I.1). Si cette courbe nous amène à séparer trois phases la phase d'initiation, d'état et la phase de résolution de l'inflammation il est important de garder à l'esprit que les éléments participants à ce phénomène dynamique (molécules, cellules) sont présents à toutes les phases et que la présentation séquentielle que nous allons utiliser pour présenter ces éléments est dictée par l'aspect pratique de l'exposition.

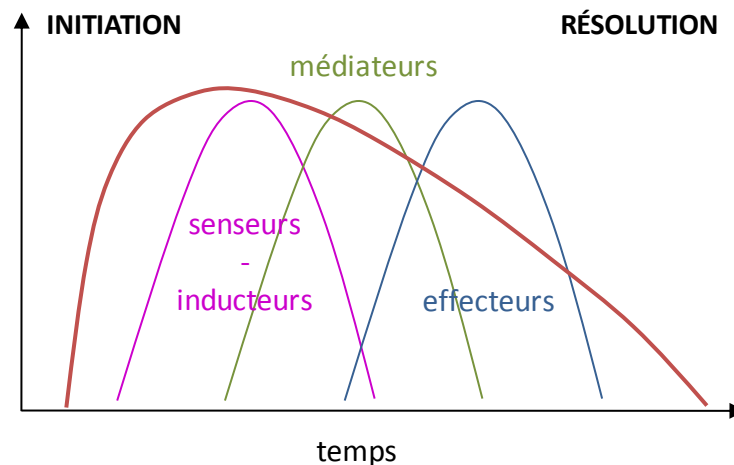


Figure I.1 : Aspect schématique de la réponse inflammatoire comme réponse graduée faisant intervenir plusieurs acteurs de manière séquentielle. Ce processus dynamique peut se séparer en trois phases. L'initiation, la phase d'état et la résolution.

2.1 Un processus régulé

Le caractère séquentiel du processus inflammatoire possède comme corollaire le caractère régulé de l'intervention des différents protagonistes que sont : les initiateurs qui vont être détectés par les senseurs, déclenchant à leur tour la sécrétion de médiateurs permettant le recrutement des cellules effectrices. Nous allons maintenant détailler chacun de ces éléments.

2.2 Initiation : sources exogènes et endogènes

Les inducteurs se répartissent traditionnellement en sources endogènes et exogènes (Figure I.2 et Tableau I.1)

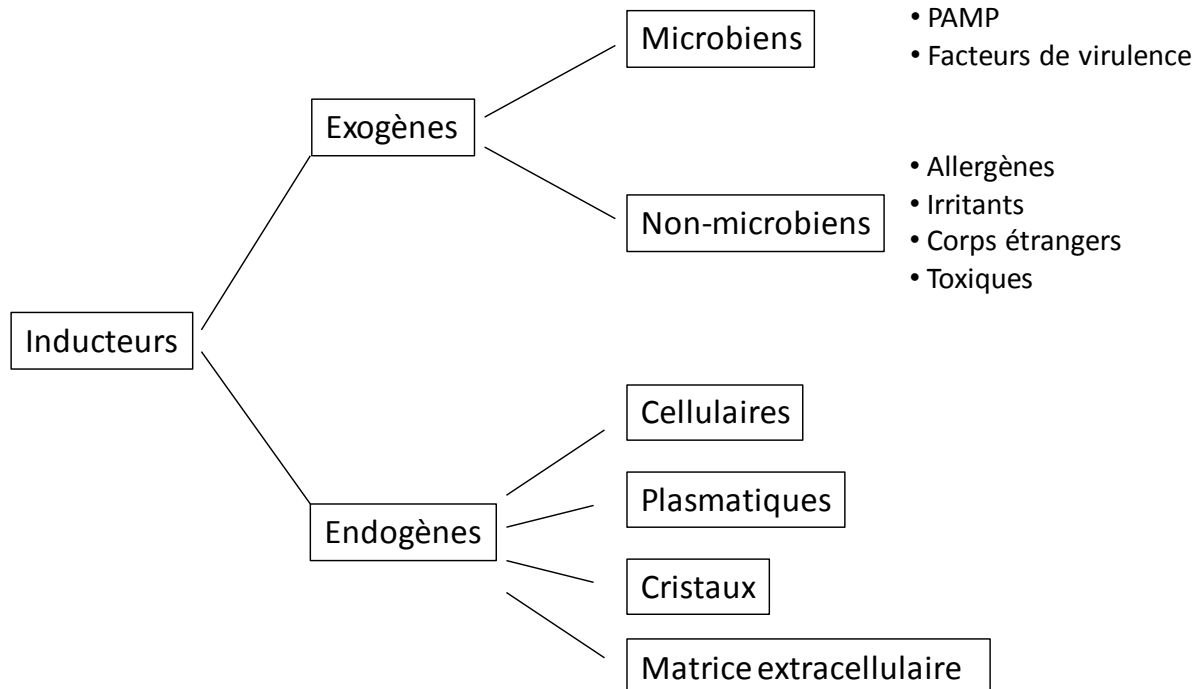


Figure I.2 : représentation des différents inducteurs en formes exogènes et endogènes

2.2.1. Sources exogènes

Les inducteurs exogènes de l'inflammation sont traditionnellement répartis en microbiens et non microbiens. Les inducteurs non microbiens regroupent les allergènes, des irritants divers et les corps étrangers. Les corps étrangers sont des particules que les macrophages n'arrivent pas à phagocyter. L'absence de message de surface du soi (comme CD47) et la taille provoque la phagocytose, mais l'impossibilité de constituer un phagosome (« phagocytose frustrée ») déclenche la formation d'un granulome autour de la particule et parfois plusieurs macrophages peuvent fusionner ensemble pour former une « cellule géante » dans le but d'encapsuler la particule. Ce mécanisme survient par exemple dans le cas de particules de silice ou d'amiante (asbestose). Les inducteurs microbiens quant à eux sont formés de deux classes : les PAMP et les facteurs de virulence. Les PAMP (Pathogen-associated molecular pattern) sont un ensemble de motifs moléculaires (soit la molécule entière mais le plus souvent une partie seulement) présents chez les pathogènes pour lesquels l'organisme a développé des récepteurs permettant la reconnaissance de ces

motifs. Ces molécules sont très souvent vitales et conservées dans un groupe large de pathogènes (Medzhitov & Janeway 1997). Une classe majeure de récepteurs sur lesquels nous reviendrons est formée des TLR (Toll-like Receptors). Comme ces récepteurs sont susceptibles de reconnaître des PAMP présents sur des bactéries commensales (Rakoff-Nahoum *et al.* 2004), ce mécanisme de reconnaissance fait l'objet d'une régulation fine comme l'illustre le rôle de A20 impliquée dans la régulation négative des TLR (ce fait est illustré par les souris A20^{-/-} qui développent une inflammation léthale) (Turer *et al.* 2008). Les pathogènes peuvent aussi présenter des inducteurs de l'inflammation non retrouvés chez les commensaux ce sont par exemple des facteurs de virulence. Un exemple est donné par les exotoxines formant des pores membranaires qui activent l'inflammasome NALP3 (NACHT, leucine-rich-repeat- and pyrin-domain-containing protein) qui est sensible à l'efflux d'ions potassium résultant de la formation du pore (Mariathasan *et al.* 2004). Il est intéressant de noter que cette activation de NALP3 peut aussi survenir après la phagocytose, qui peut elle-même être « frustrée », de corps étrangers (Dostert *et al.* 2008).

2.2.2. Sources endogènes

Les inducteurs endogènes regroupent de manière hétérogène tous les signaux produits par un tissu dysfonctionnel ou lésé. Ce groupe peut provenir d'une infection par exemple et dans ce cas facteurs inducteurs exogènes et endogènes seront présents de manière simultanée. L'idée générale qui permet de regrouper ces signaux dans un même groupe est l'utilisation par l'organisme de la reconnaissance moléculaire de composants normalement compartimentés dans un tissu sain. Ces signaux aussi appelés « alarmines » ou DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern) sont très divers : ATP, K⁺, acide urique, HMGB1 (High-mobility group box 1 protein), la famille des protéines S100 (S100A8, S100A9 et S100A12), HDGF (Hepatoma-derived growth factor), les protéines de choc thermique (HSP : Heat shock Protein) pour en nommer quelques unes (Bianchi 2007). Ces alarmines peuvent être libérées passivement par perméabilité de la membrane plasmique lors d'une nécrose cellulaire ou bien lors d'un mécanisme actif de sécrétion non canonique (indépendant de la voie Réticulum Endoplasmique-Golgi) impliquant l'inflammasome (via la caspase 1 activée) (Keller *et al.* 2008). La dé- compartimentation d'éléments cellulaires peut se produire lorsqu'une interaction épithélium/ mésenchyme normalement absente d'un tissu normal (séparation par la membrane basale) apparaît lors d'une agression tissulaire. L'exemple qui

vient à l'esprit est la rupture de la barrière épithéliale au niveau de l'intestin qui permet aux bactéries commensales d'engager les TLR des macrophages de la *lamina propria* (Rakoff-Nahoum *et al.* 2004). Autre exemple de décloisonnement compartimental interprété comme un message de danger, l'interaction entre le facteur XII (facteur Hageman) et le collagène lors d'une atteinte endothéliale qui engage plusieurs cascades protéolytiques (coagulation, fibrinolyse et complément) induisant une réaction inflammatoire (médiée en partie par les plaquettes). Une autre classe d'inducteurs endogènes plus impliqués dans l'inflammation chronique que dans la réaction aiguë est formée des cristaux d'urate de sodium (Goutte), de pyrophosphate de calcium (Chondrocalcinose), des PTG (produits terminaux de glycation) et des lipoprotéines oxydées. Les PTG (AGE advanced glycation end products en anglais) qui sont des produits de la glycation non enzymatique de protéines de longue durée de vie comme le collagène sont reconnues par leur récepteur RAGE (receptor of advanced glycation end products) qui produit une réaction inflammatoire via l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Kierdorf *et al.* 2013). La production de PTG est rencontrée dans les situations d'accumulation d'oxydants (comme le diabète insulino-dépendant ou non et le vieillissement) et s'associe avec l'oxydation des lipides transportés par le HDL et LDL les transformant en signaux d'alarme inflammatoires. Les espèces réactives de l'oxygène sont aussi susceptibles d'endommager les composants de la matrice extracellulaire provoquant la libération de hyaluronate de petit poids moléculaire qui activent le TLR4 (Jiang *et al.* 2005). Nous avons regroupé une liste (non exhaustive) des signaux d'initiation dans le tableau I.1 avec leurs récepteurs connus ou supposés.

2.3. Les récepteurs de signaux dangers

Les récepteurs de signaux dangers sont constitués des PRR (Pattern Recognition Receptor) regroupant les TLR (Toll-Like Receptors) qui sont trans-membranaires et endosomaux, les RLR (RIG-I-Like Receptors) qui sont intracellulaires, les NLR (NOD-Like Receptors) qui sont cytoplasmiques et les CLR (C-type Lectin Receptors) qui sont transmembranaires (Tableau I.2); un autre récepteur de signaux dangers est le récepteur transmembranaire RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-products) qui reconnaît les produits terminaux de la glycation (PTG) mais aussi HMGB1, les protéines S100 et la protéine β -amyloïde.

Tableau I.1 : Principaux signaux d'initiation (« dangers ») de l'inflammation stérile (d'après Chen & Nunez, 2010)

Signaux inflammatoires stériles	Récepteurs pressentis
Endogènes	
HMGB1	TLR2, TLR4, TLR9, RAGE et CD24
Les HSP	TLR2, TLR4, CD24, CD91, CD14, CD40
Protéines S100	RAGE
SAP130	MINCLE (CLEC4E)
ARN	TLR3
ADN	TLR9, AIM2
Cristaux (acide urique, pyrophosphate de calcium)	NLRP3
ATP	NLRP3
Hyaluronane	TLR2, TLR4, CD44
Biglycane	TLR2, TLR4
Versicane	TLR2
Héparane Sulfate	TLR4
fMLF (mitochondrie)	FPR1
ADN (mitochondrie)	TLR9
β -amyloïdes	NLRP3, CD36, RAGE
Cristaux cholestérol	NLRP3, CD36
IL1- α	IL1-R
IL-33	ST2
Exogènes	
Silice	NLRP3
Amiante	NLRP3

Ces récepteurs membranaires ou intracellulaires présentent une spécificité de reconnaissance large portant sur les éléments conservés des microorganismes si on la compare à la spécificité de la reconnaissance par les cellules de l'immunité adaptative (Medzhitov 2007). L'expression de ces récepteurs ne se limite pas aux cellules immunes et de nombreuses cellules non immunes les expriment.

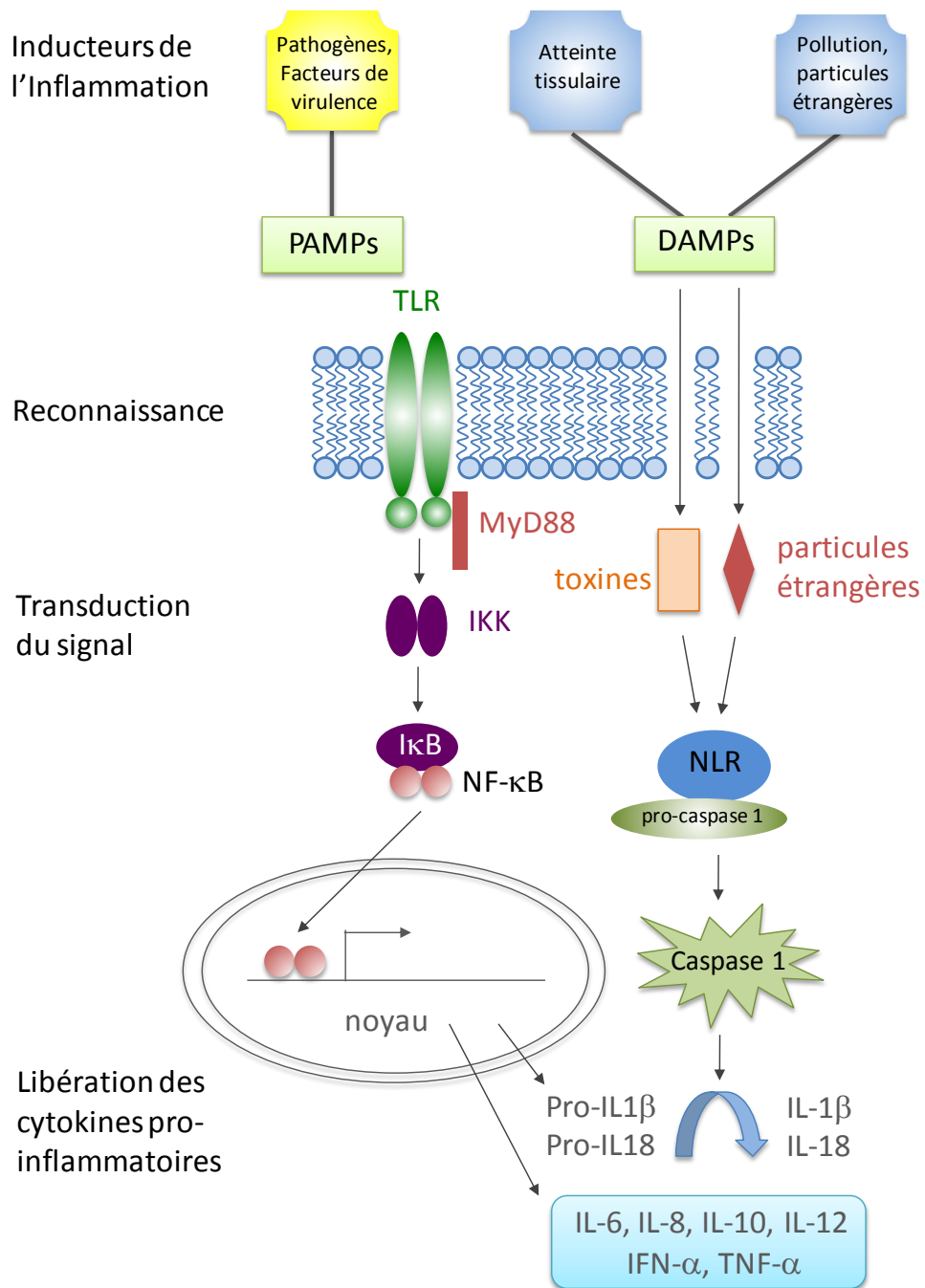


Figure 1.3 : Représentation schématique de la signalisation des PAMP et des DAMP (adapté de Mak 2004)

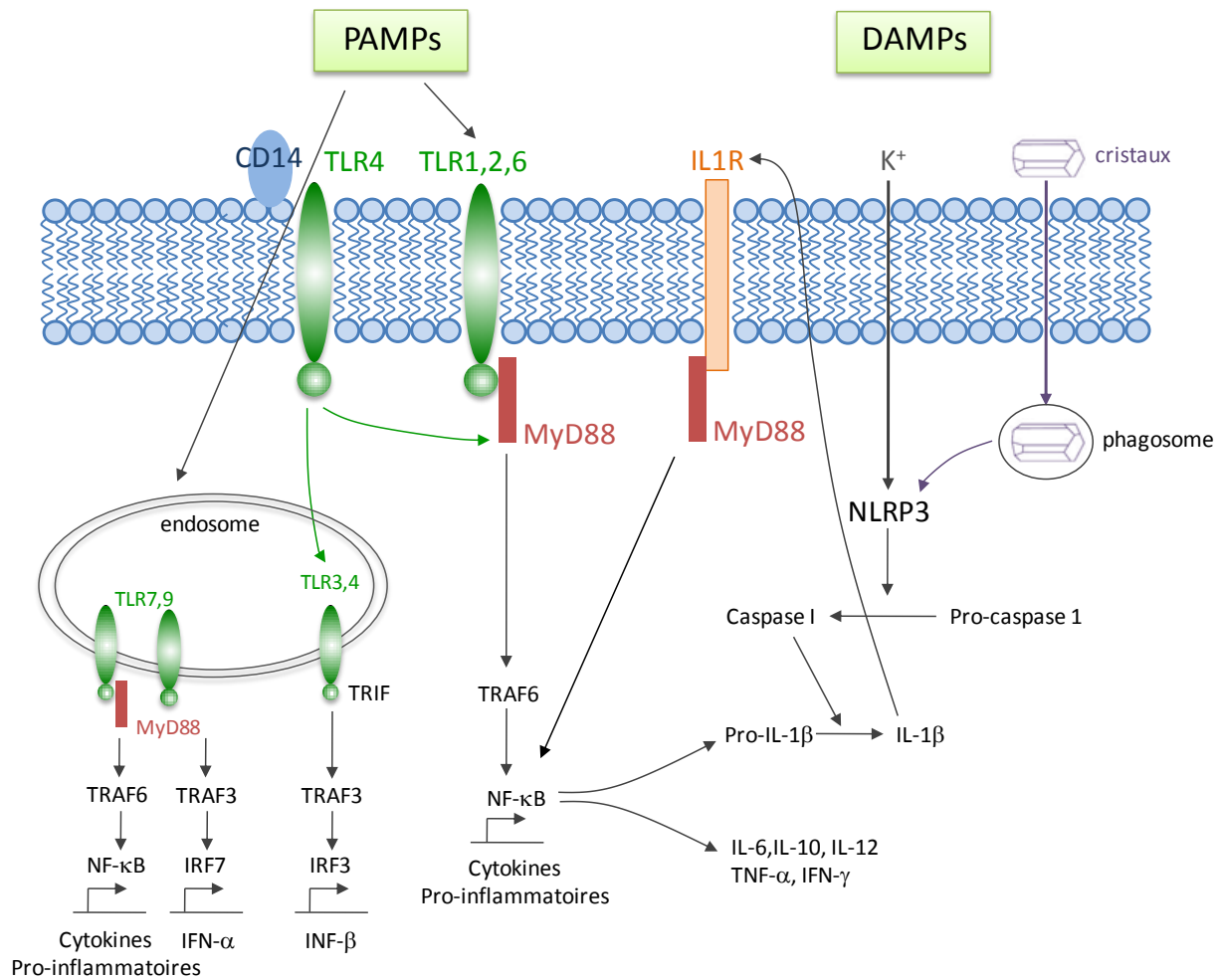


Figure I.4 : Signalisation des TLR. Cette signalisation est dépendante du TLR impliqué. Certains TLR comme TLR4 ont plusieurs voies de signalisation possibles (MyD88 dépendante ou indépendante). Adapté de Takeuchi & Akira 2010.

La signalisation des PRR est un processus complexe impliquant de nombreuses protéines. De manière synthétique nous pouvons représenter la signalisation qui suit l'activation d'une cellule par des DAMP ou PAMP comme représenté sur la figure I.3. Néanmoins la signalisation via les TLR est dépendante du TLR concerné (Takeuchi & Akira 2010) (Figure I.4). Les lipoprotéines se lient à un hétérodimère de TLR1/6 et TLR2 la liaison avec le ligand provoquant le recrutement de l'adaptateur MyD88. Le LPS se fixe lui sur TLR4 en association avec CD14 (Zanoni *et al.* 2011), la signalisation de TLR4 peut se faire par un mécanisme MyD88 dépendant via TRAF-6 résultant en une phosphorylation de NEMO et une activation du complexe IKK de manière similaire à l'activation de TLR 1, 2 et 6. L'activation de NF-κB qui en résulte se traduit par la synthèse d'IL-6, IL-10, IL-12, INF-γ, TNF-α et pro-IL1-β. Une autre

voie pour TLR4 est une voie endosomale associée à TRAM avec une activation de la voie de signalisation TRIF-dépendante de manière identique à l'activation de TLR3 par de l'ARN double brin résultant alors dans l'activation de NF- κ B et de IRF3 induisant la synthèse d'interféron de type I. Les TLR7 et 9 reconnaissent quand à eux l'ARN simple brin viral et le motif CpG bactérien respectivement. La liaison avec leurs ligands provoque le recrutement de MyD88, TRAF6 et TRAF3 induisant la phosphorylation puis translocation au noyau d'IRF7 qui induit la synthèse d'interférons de type I mais aussi l'activation de NF- κ B. Ces TLR peuvent aussi être activés par de l'ADN re-larguée par une cellule lésée qui via une interaction avec HMGB1 et la liaison au récepteur RAGE leur sera présenté.

Tableau I.2 : Les PRR, leur localisation et ligands (d'après Takeuchi & Akira, 2010)

PRR	Localisation	Ligand	Origine du ligand
TLR			
TLR1	Membrane plasmique	Triacyl des Lipoprotéines	Bactéries
TLR2	Membrane plasmique	Lipoprotéines	Bactéries, Virus, Parasites, Soi
TLR3	Endosome	ARN double brin	Virus
TLR4	Membrane plasmique	LPS	Bactéries
TLR5	Membrane plasmique	Flagelline	Bactéries
TLR6	Membrane plasmique	Diacyl des Lipoprotéines	Bactérie, Virus
TLR7 (TLR8 humain)	Endosome	ARN simple brin	Bactéries, Virus, Soi
TLR9	Endosome	ADN CpG	Bactérie, Virus, Protozoaires, Soi
TLR10	Endosome	Inconnu	Inconnu
TLR11	Membrane plasmique	Profilline	Protozoaires
RLR			
RIG-I	Cytoplasme	ARN simple brin court	ARN viral, ADN viral
MDA5	Cytoplasme	ARN simple brin long	ARN viral
MGP2	Cytoplasme	Inconnu	ARN viral
NLR			
NOD1	Cytoplasme	iE-DAP	Bactéries
NOD2	Cytoplasme	MDP	Bactéries
CLR			
Declin-1	Membrane plasmique	β -glucane	Champignons
Declin-2	Membrane plasmique	β -glucane	Champignons
MINCLE	Membrane plasmique	SAP130	Champignons, Soi

2.4. Les médiateurs

Les inducteurs de l'inflammation stimulent la production de médiateurs issus du plasma ou sécrétés par les cellules présentes sur le site inflammatoire (macrophage résidents, mastocytes, basophiles, plaquettes). La concentration des médiateurs plasmatiques peut être grandement augmentée en phase aiguë de l'inflammation par synthèse hépatique. Ces médiateurs sont classés en fonction de leurs caractéristiques biochimiques (Medzhitov 2007) :

- Les amines vasoactives : histamine et sérotonine

Libérées lors de la dégranulation des mastocytes et des plaquettes leurs effets se concentrent sur le système vasculaire avec une résultante contextuelle pouvant être une augmentation de la perméabilité vasculaire et une vasodilatation ou bien au contraire une vasoconstriction. Ces amines vasoactives sont responsables des manifestations cliniques graves du choc anaphylactique.

- Les peptides vasoactifs : substance P, kinines, fibrinopeptides, produits de dégradation de la fibrine

La substance P a la particularité d'être sécrétée par les neurones sensoriels et d'être capable de faire dégranuler les mastocytes. Les autres peptides sont générés par la cascade de la coagulation à travers l'activité protéolytique du XIIa, de la thrombine et de la plasmine avec comme conséquence une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire en addition de l'effet de l'histamine. Le XIIa est aussi à l'origine de la production de bradykinine qui est vasodilatateur et proalgique.

- Les anaphylatoxines : C3a, C4a et C5a

Le système du complément est un système complexe de protéines très conservé dans l'arbre phylogénétique permettant comme son nom l'indique de compléter les réactions immunes et inflammatoires. Ce système fait partie de la première ligne de défense contre une invasion microbienne mais il participe aussi à la maturation synaptique, la clairance des complexes immuns, l'angiogénèse, la mobilisation des progéniteurs de cellules souches hématopoïétiques, la régénération tissulaire et le métabolisme lipidique (Ricklin *et al.* 2010). De manière très schématisée l'activation de ce système peut se faire par 3 voies (classique, voie des lectines et voie alternative) représentées sur la figure I.4. Les facteurs C3, C4 et C5 sont susceptibles d'être clivés par des enzymes autres que celles de la voie du complément. Il s'agit de la kallikréine, de la plasmine et d'enzyme lysosomales. Les fragments actifs C3a,

C4a et C5a sont appelés anaphylatoxines en raison de l'expression clinique de certaines infections bactériennes invasives s'accompagnant de collapsus cardiovasculaire et de spasme bronchique évoquant un choc anaphylactique. C3a, C4a mais surtout C5a provoque la dégranulation des mastocytes et basophiles libérant les amines vasoactives déjà citées. C5a est aussi un puissant chimioattractant des neutrophiles et des monocytes.

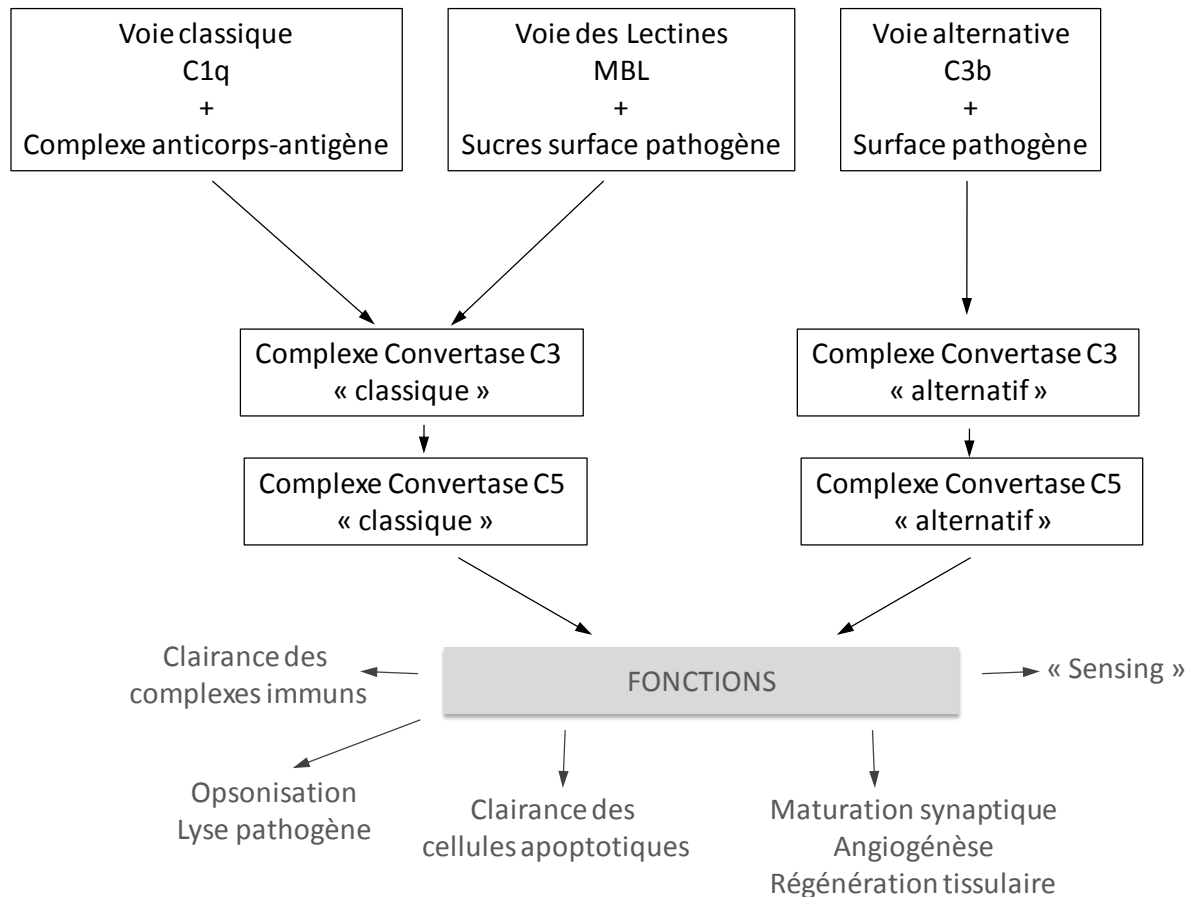


Figure 1.4 : Représentation schématique de l'activation du complément et de ses fonctions (Adapté de Ricklin *et al.*, 2010).

- Les médiateurs lipidiques : eicosanoides et PAF (platelet-activating factors)

Les médiateurs lipidiques sont issus de phospholipides, comme la phosphatidylcholine, présents dans la membrane plasmique. A partir de ces phospholipides la phospholipase A2 va générer de l'acide arachidonique et de l'acide lysophosphatidique. L'acide arachidonique donnera les prostaglandines et les thromboxanes par l'action des cyclooxygénases (COX1 et COX2) et par l'action des lipooxygénases les leucotriènes et les lipoxines. Les prostaglandines PGE2 et PGI2 sont responsables d'une vasodilatation, et PGE2 est aussi un inducteur de fièvre et de sensations douloureuses. Les lipoxines aux fonctions

anti-inflammatoires seront discutées dans le chapitre portant sur la résolution de l'inflammation. L'acétylation de l'acide lysophosphatidique donne le facteur d'activation des plaquettes (PAF) qui en plus de son action sur les thrombocytes peut provoquer une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire et l'activation de neutrophiles.

- Enzymes protéolytiques

Dans ce groupe hétérogène on retrouve les enzymes extracellulaires qui s'opposent à l'effet des molécules d'adhérence de la matrice extracellulaire notamment. Ce sont les métalloprotéases (MMP) dont les collagénases (MMP 1, 8, 13, 18) qui dégradent le collagène fibrillaire, les gélatinases (MMP 2,9) qui dégradent la gélatine et l'élastine, les stromélysines (MMP3, 10,11) qui dégradent les protéoglycanes, la fibronectine et la lamine et enfin les MMP transmembranaire (MMP 14-17) qui activent la MMP2 (Gelatinase A). Cette famille de protéine récemment élargie des ADAM (membrane-anchored disintegrin metalloproteinases) et des méprines joue un rôle majeur dans la régulation de la signalisation en aval des récepteurs du TNF- α et de l'IL-6 mais aussi de l'EGF-R et de Notch dont le rôle dans la réaction inflammatoire est majeur (Khokha *et al.* 2013).

On trouve aussi dans ce groupe les sérines protéases comprenant les trypsines, l'élastase, la cathepsine G et la protéinase 3, la plasmine, l'urokinase et les enzymes de la cascade de la coagulation et du complément. D'autres protéases sont incluses dans ce groupe la papaïne, les cathépsines B, D et K et la pepsine. L'activité de ces protéases est régulée par l'action d'inhibiteurs comme les SERPINs (Serine protease inhibitors) dont l' α 1-antitrypsine qui inhibe l'élastase et la protéinase 3 qui sont des sérines protéases du neutrophile, les MMP sont quand à elles inhibées par les TIMPs (Tissue inhibitors of metalloproteinases) et l' α 2-macroglobuline.

- Les cytokines pro-inflammatoires et les chimiokines

Ce sont des éléments essentiels que nous les détaillons plus loin dans le chapitre consacré aux effecteurs de la réponse inflammatoire.

Si de manière très simplifiée, mais suggérée par le découpage artificiel que nous avons adopté, la réaction inflammatoire peut se schématiser par la chaîne suivante (Medzhitov 2008) :

inducteur \rightarrow *senseurs* \rightarrow *médiateurs* \rightarrow *effecteurs*

Il est toutefois difficile de définir quels sont les médiateurs résultant d'un déclencheur particulier sachant que de nombreux médiateurs sont eux même des inducteurs de la production d'autres médiateurs. Comprendre la hiérarchie fonctionnelle entre ces différents niveaux est un enjeu majeur de la compréhension de la réponse inflammatoire.

2.5 Les effecteurs cellulaires

Lors de l'initiation d'une réaction inflammatoire la présence de DAMP ou PAMP est détectée en premier par des cellules résidentes du tissu lésé. Les macrophages résidents sont parmi les cellules les plus impliquées dans le 'sensing' des signaux dangers et la reconnaissance de composants microbiens, les cellules dendritiques peuvent aussi jouer ce rôle. Le scénario est le suivant : la mort cellulaire en lien ou non avec une infection va s'accompagner de la présence de signaux dangers dans le milieu extracellulaire. HMGB1 est un représentant connu de ce type de signal, il interagit avec d'autres DAMP comme l'ADN simple brin et se lie au récepteur RAGE mais aussi à TLR2, 4, 9 et IL-1R (Tian *et al.* 2007, Yanai *et al.* 2009). L'activation des TLR peut se faire par un mécanisme dépendant de MyD88 qui résulte dans l'activation de NF- κ B de manière similaire à une activation par un PAMP. L'activation des macrophages résultant de cette action de HMGB1 est la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, le TNF- α mais aussi de des chimiokines comme CXCL8 (connue aussi sous le nom d'IL-8), CCL3 et CCL4 qui favorise le recrutement de neutrophiles. Une particularité de l'activation des macrophages par HMGB1, qui permet de relativiser la similarité entre DAMP et PAMP, est son interaction avec CD24. En effet cette interaction qui n'existe pas pour les PAMP permet à l'organisme de différencier une atteinte infectieuse ou non est d'offrir un premier niveau de contre régulation permettant d'éviter un emballement de la réaction inadéquate en l'absence de pathogène. En effet CD24 (qui est une protéine à ancrage GPI) permet une signalisation via SIGLEC-G (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin G) qui possède un motif ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) dont l'activation résulte en une inactivation du facteur de transcription NF- κ B et donc diminue la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (Chen *et al.* 2009). De multiples signaux, que nous avons décrits dans le tableau I.1, sont susceptibles de déclencher via une interaction avec leur(s) récepteur(s) une sécrétion de chimiokines attirant les neutrophiles vers le site inflammatoire. Cette production n'est pas restreinte à une liaison avec un

récepteur, en effet les espèces réactives de l'oxygène (ROS reactive oxygen species) en plus de leur rôle anti-bactérien peuvent induire l'expression de TRPM2 (transient receptor potential protein M2) un canal calcique présent sur les monocytes qui active la voie ERK et la translocation de NF- κ B au noyau avec pour résultante la sécrétion de chimiokines attirant les neutrophiles (Yamamoto *et al.* 2008). Comme nous venons de le voir la place des monocytes dans cette phase précoce de l'inflammation doit être précisée. La découverte de sous populations monocytaires a permis de clarifier le rôle des monocytes dits « non-classique » qui chez la souris sont caractérisés par l'expression $\text{Ly6C}^{\text{CX3CR1}^{\text{hi}}\text{CCR2}^{\text{CD62L}^{\text{L}}}}$. Ces monocytes ont été montrés patrouillant sur la paroi des vaisseaux à l'état d'équilibre et comme étant très rapidement recrutés sur un site infectieux (*L. monocytogenes*) ou lors d'une inflammation stérile (Auffray *et al.* 2007). Quand aux monocytes dits « inflammatoires », leur rôle sera précisé dans la section 2.5.3.

Dans cette phase précoce de l'inflammation dont la fonction est principalement le recrutement de neutrophiles sur le site du tissu lésé, les chimiokines sont essentielles. Les chimiokines forment une superfamille de protéines classées en fonction de l'organisation des deux dernières cystéines en N-terminal d'un groupe de quatre cystéines conservées avec des ponts disulfure entre C1-C3 et C2-C4. Quatre familles sont décrites : CXC, CC, (X)C et CX₃C. Dans la famille CXC un seul acide aminé sépare les deux cystéines, dans la famille CC elles sont adjacentes. CX₃C ne possède qu'un seul élément la fractalkine ayant 3 acides aminés séparant les deux cystéines. Dans la famille (X)C C1 et C3 sont manquantes. Ces chimiokines sont regroupées fonctionnellement en chimiokines inflammatoires ayant comme fonction le recrutement des leucocytes sur le site inflammatoire, on décrit aussi des chimiokines homéostatiques, présentes dans les organes lymphoïdes, elles sont impliquées dans le 'homing' lymphocytaire. Certaines partagent les deux fonctions elles sont alors décrites comme duales et enfin certaines sont décrites comme plaquettaires en lien avec leur localisation dans les granules α des thrombocytes (Zlotnik & Yoshie 2012). Ces chimiokines ont des récepteurs dédiés faisant partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G : on distingue les CXCR, CCR, XCR, CX₃CR et les atypiques (Zlotnik & Yoshie 2012). La plupart de ces récepteurs ne sont pas spécifiques et sont capables de lier un grand nombre de ligands. Dans une vision schématique nous regroupons dans le tableau I.3 les

principales chimiokines et leurs récepteurs responsables du recrutement des neutrophiles (en se basant sur la nomenclature chez l'humain) dans la première phase de l'inflammation.

Tableau 1.3 : Principales chimiokines impliquées dans le recrutement leucocytaire (adapté de Soehnlein & Lindbom, 2010 ; Zlotnik & Yoshie, 2012)

Chimiokine	Correspondance chez la souris	Source	Récepteur	Mécanisme déclenchant la production	Fonction
CXCL1	Cxcl3 (KC)	Macrophage	CXCR2	Cellules nécrotiques (CLR, ROS, HMGB1)	Recrutement neutrophiles
CXCL2	Cxcl2	Macrophage	CXCR2	Cellules nécrotiques (CLR, ROS, HMGB1)	Recrutement neutrophiles
CXCL5	-	Macrophage Eosinophiles Cellules épithéliales	CXCR2	Activité MMP8 dépendante	Recrutement neutrophiles
CXCL8 (IL-8)	-	Macrophages Neutrophiles	CXCR2	ROS, clivage par MMP8, 9	Recrutement neutrophiles monocytes
CCL2 (MCP-1)	Ccl2	Macrophages Cellules endothéliales	CCR2	IL-6, exposition contenu granule des neutrophiles	Recrutement monocytes inflammatoires
CCL3 (MIP1-α)	Ccl3	Macrophages Cellules endothéliales neutrophiles	CCR1	exposition contenu granule des neutrophiles	Recrutement monocytes inflammatoires
CCL4	Ccl4	Monocytes inflammatoires	CCR1	Activation transcriptionnelle	Recrutement monocytes inflammatoires
CCL15	Ccl9 (MIP1- γ)	Monocytes inflammatoires	CCR1	Activation clivage protéases du neutrophile	Recrutement monocytes inflammatoires
CCL20	Ccl20	Monocytes inflammatoires	CCR6	Activation transcriptionnelle	Recrutement monocytes inflammatoires
CCL23	Ccl6	Monocytes inflammatoires	CCR1	Activation clivage protéases du neutrophile	Recrutement monocytes inflammatoires

L'action de ces chimiokines est amplifiée par la présence de protéase comme MMP9 sécrétée par les macrophages (mais aussi les cellules endothéliales et les neutrophiles) qui clive et augmente l'activité chimiotactique de CXCL1 et CXCL8 (Van den Steen *et al.* 2000). Les macrophages et les neutrophiles sécrètent aussi MMP8 qui clive CXCL5 et CXCL8 permettant l'attraction des neutrophiles via CXCR2. D'autres molécules sont susceptibles de permettre le recrutement de neutrophiles : les médiateurs lipidiques. Les macrophages sécrètent le leukotriène B4 qui est un puissant chimioattractant de neutrophiles, mais aussi un activateur des neutrophiles permettant la dégranulation et la production de ROS par le récepteur BLT1 à la surface du neutrophile (Tager *et al.* 2003). Les leukotriènes B4 sont aussi capables de provoquer leur sécrétion autocrine par les neutrophiles.

2.5.1 L'extravasation des neutrophiles

De nombreux travaux se sont intéressés au phénomène fascinant du recrutement des neutrophiles sur la paroi des vaisseaux et leur extravasation dans le contexte du recrutement de ces cellules vers un site inflammatoire. Ce processus est classiquement décomposé en une phase d'accrochage (Tethering) au cours de laquelle un neutrophile circulant va s'accrocher à l'endothélium. Ce recrutement est initié par l'action de signaux inflammatoires (histamine, leucotriènes, cytokines) qui vont via les PRR activer l'endothélium. L'expression rapide de P-selectine (~ minutes) puis de E-selectine (~ 90 min) à la surface des cellules endothéliales permet l'interaction avec leur ligand se trouvant exprimer par les neutrophiles le PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1) et engage la phase suivante de roulement (Rolling) (Zarbock *et al.* 2011). Les forces de liaisons P-selectine/PSGL-1 sont contrebalancées par les forces de cisaillement (shear stress) liées à l'écoulement sanguin. Il a été constaté expérimentalement que le roulement de neutrophiles peut se maintenir avec des forces de cisaillement de ~ 10 dynes/cm² (Sundd *et al.* 2012) que l'on peut rencontrer dans les vaisseaux inflammatoires. Ceci implique une création/destruction des attaches à l'endothélium rapide (Ramachandran *et al.* 2004). La rupture de l'attache postérieure doit être compensée par la création d'une attache antérieure, ce qui a été mis en évidence expérimentalement (Sundd *et al.* 2010). Cette attache ne se rétracte pas lorsque postérieure elle est soumise à une tension trop forte pour maintenir la liaison mais forme une 'écharpe' (sling) recouverte de LFA-1 qui permet la liaison aux ICAM (notamment ICAM2) et va permettre au neutrophile de s'enrouler dans cette excroissance de membrane

et « roulé » sur l'endothélium ce mécanisme est appelé « step-wise peeling of slings » (Sundd *et al.* 2012) (Figure I.5).

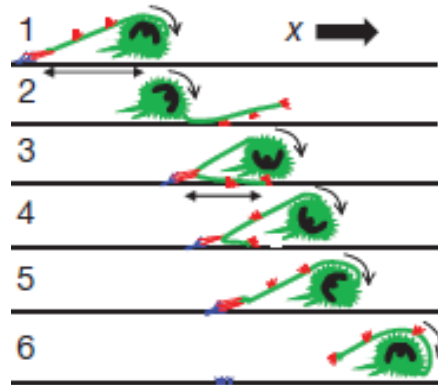


Figure I.5 : Décomposition des différentes phases du processus physique de la phase de « rolling » d'un neutrophile reposant sur l'utilisation d'une excroissance de la membrane comportant de nombreuses molécules de LFA-1 qui est projeté sur l'endothélium permettant l'accrochage du neutrophile. Le sens du déplacement du neutrophile est représenté par le vecteur X (Sundd *et al.* 2012).

La phase de roulement sera suivie par l'adhérence ferme du neutrophile sur l'endothélium qui va mener à sa transpédèse objectif final de cette séquence. Le lieu de cet arrêt est déterminé par l'état de l'endothélium qui au voisinage d'un site inflammatoire se trouvera activé par des cytokines, des PAMP, des microparticules ou des protéines granulaires du neutrophile. Cette activation va se traduire par l'exposition de chimiokines (CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL8) qui chargées positivement vont être maintenues par des héparanes sulfates chargées négativement dans l'endothélium (Massena *et al.* 2010). Ce gradient chimiotactique intra vasculaire va permettre l'extravasation. Ces chimiokines vont induire une activation du neutrophile qui via des récepteurs couplés aux protéines G (comme CXCR2) va modifier la conformation de ses β -intégrines (LFA-1 ou CD11a/CD18, MAC1 ou CD11b/CD18) ce qui permettra une liaison forte aux ICAM 1 et 2 (Phillipson *et al.* 2006). L'adhérence ferme s'associe à une phase d'exploration (crawling) pour trouver une jonction entre 2 cellules endothéliales qui est le site préférentiel de transmigration. Cette recherche est un mécanisme ICAM1/MAC1 dépendant. Le mécanisme d'exploration du neutrophile sous contrainte de cisaillement est mal compris mais certains mécanismes de modification de la conformation des β 2 intégrines par l'intervention de MABP-1 (mammalian actin-

binding protein 1) et sa liaison à l'actine semblent fondamentaux pour l'adhérence des neutrophiles dans cette phase (Hepper *et al.* 2012).

La transmigration des neutrophiles a été l'objet d'intenses débats entre les tenants de l'hypothèse d'un passage des neutrophiles en para cellulaire ou en trans cellulaire. Il est actuellement admis que les deux mécanismes sont utilisés par le neutrophile comme illustré sur la Figure I.6.

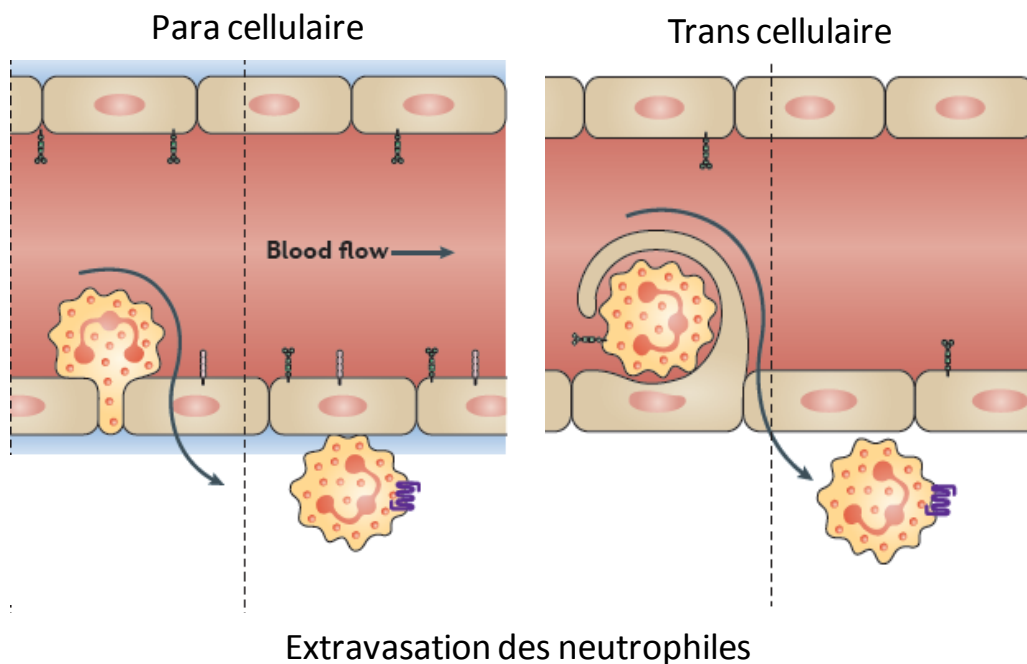


Figure I.6 : La transpédèse des neutrophiles peut se faire par deux mécanismes : para cellulaire ou trans-cellulaire. Il est maintenant admis que ces deux mécanismes existent mais que la voie para cellulaire est la principale (Kolaczowska *et al.* 2013).

La voie para cellulaire semble toutefois préférée en raison de sa rapidité. Car pour traverser l'endothélium et la membrane basale la voie para cellulaire nécessite ~ 2-5 min + 5-15 min respectivement (Ley *et al.* 2007). Le même parcours pour la voie trans cellulaire atteint 20-30 min (Phillipson *et al.* 2008). Du côté endothélium la liste des molécules impliquées dans la transmigration n'a cessé d'augmenter au fil des ans : les molécules d'adhésion intercellulaires (ICAM1, ICAM2, VCAM1), les molécules de jonction (JAM), les ECAM (epithelial cell adhesion molecules), CD99 mais aussi au rôle moins bien définis CD155, CD157, VAP1 (vascular adhesion protein 1), LSP1 (leukocyte specific protein 1). Le processus de transmigration est accompagné de modification du cytosquelette des cellules

endothéliales et d'un réarrangement de la matrice extracellulaire au niveau des points d'adhérence focaux avec une perte sélective de paxilline et de FAK (focal adhesion kinase) (Parsons *et al.* 2012). Les neutrophiles qui possèdent une grande quantité de protéases (comme MMP9) susceptibles de cliver les composants de la matrice extracellulaire (collagènes, laminines), les utilisent probablement pour faciliter leur transmigration. Toutefois les preuves d'inhibition pharmacologique de ce phénomène manquent (Kolaczowska *et al.* 2013). L'explication la plus courante de ce manque de preuve et l'activité compensatoire des autres protéases comme l'élastase qui peut remplacer la délétion de MMP9 dans un modèle animal d'inflammation péritonéale (Kolaczowska *et al.* 2009). Un autre rôle joué par les protéases du neutrophile dans la transmigration a été mis en évidence récemment, il s'agit de l'exposition de protéinase 3 (PR3, protéase des granules du neutrophile Cf partie III) à la membrane du neutrophile via son interaction avec CD177. Cette protéine à ancrage GPI interagit avec PECAM1, le blocage de cette liaison inhibant la transmigration. De manière supplémentaire cette protéine de membrane qui n'est exprimée que sur un pourcentage fixe de neutrophiles permet l'expression membranaire de PR3 et l'activité catalytique de cette dernière favorise la transmigration des neutrophiles (Kuckleburg *et al.* 2012). Si les protéases du neutrophile semblent jouer un rôle les études en microscopie intravitale ont plutôt montré que les neutrophiles préfèrent les zones de faible expression de molécules de la matrice extracellulaire. Ce constat a permis de réaliser que ces zones correspondaient aux espaces libres entre pericytes. Ces cellules qui enveloppent les vaisseaux sont sensibles aux DAMP et peuvent sécréter des chimiokines permettant aux neutrophiles de trouver une voie de moindre résistance pour leur transmigration vers le site inflammatoire (Stark *et al.* 2013).

2.5.2. Devenir du neutrophile après extravasation

Après extravasation le neutrophile va être confronté à des champs de chimioattractants complexes de gradients qui peuvent être opposés. Cette situation nécessite de la part du neutrophile une priorisation des signaux. Les chimioattractants sont décrits dans la littérature comme « intermédiaires » (LTB₄, CXCL8) ce sont ceux que l'on retrouve au niveau des cellules endothéliales et qui favorise le recrutement et les chimioattractants « terminaux » (end-target) comme fMLF (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine peptide bactérien) et C5a. Ces derniers sont capables de désensibiliser les récepteurs de signaux

intermédiaires comme le fMLF qui provoque la cross-phosphorylation de CXCR8 (Richardson *et al.* 1995). Cette capacité permet au neutrophile de sortir du champ d'attraction d'un premier gradient en ayant une marche au hasard, secondaire à un état de saturation de ces récepteurs vis-à-vis de ce premier signal pour se diriger alors vers un autre gradient, scénario qui a été validé expérimentalement (Foxman *et al.* 1997). Cette migration vers un gradient fait intervenir la voie PI3K (Funamoto *et al.* 2002). Mais cette possibilité de réorienter sa course en fonction des stimuli pose la question d'un mécanisme d'arrêt du neutrophile une fois la cible atteinte. Cette question a reçu une réponse séduisante récemment. Le fMLF stimule via les FPR (formyl peptide receptor, FPR1 de haute affinité et FPR2) les protéines G trimériques engageant la migration. Mais le fMLF provoque l'activité de deux MAPK : p38 MAPK qui agit comme une GRK (G protein-coupled receptor kinases) en phosphorylant FPR1 empêchant GRK2 de se lier à lui et d'inhiber la migration. Et d'autre part ERK qui induit GRK2 et inhibe donc la migration cellulaire. La balance dynamique entre p38MAPK et ERK dépendante de la concentration du stimulus contrôle donc les signaux « go » et « stop » de la migration du neutrophile (Liu *et al.* 2012). Une des découvertes récentes très intéressante vient compléter ce tableau de contrôle de la fin de la migration des neutrophiles, en effet il a été mis en évidence dans un modèle d'inflammation stérile un phénomène de transmigration inverse durant lequel les neutrophiles retournent vers la circulation (Woodfin *et al.* 2011). Quel est le rôle de cette transmigration inverse ? Peut-être que le contrôle fin de la migration décrit précédemment permet cette transmigration inverse pour épargner les neutrophiles non nécessaires sur un site sans infection ou lorsque l'infection est contrôlée ? Ou encore ce mécanisme permet-il la propagation à d'autres sites de l'inflammation ?

2.5.3. Les neutrophiles attirent les monocytes

Après leur extravasation les neutrophiles libèrent le contenu de leurs granules sur le site inflammatoire. Le contenu de ces granules a un rôle antibactérien et permet la dégradation de la matrice extracellulaire pour faciliter la migration des cellules inflammatoires sur le site (Borregaard & Cowland 1997). Les protéines de granules sécrétées ont un rôle clé dans le recrutement des monocytes, l'azurocidine protéine cationique permet l'adhésion des monocytes roulant à la surface de l'endothélium (Soehnlein *et al.* 2009), LL37 (forme clivée de CAP18 : cationic antimicrobial protein) via son interaction avec FPR2 provoque la

chimiotaxie des monocytes (De *et al.* 2000) et la cathepsine G via son interaction avec FPR1 de même (Chertov *et al.* 1997). Les monocytes recrutés sont des monocytes « classiques » car chez la souris la déplétion en neutrophiles limite le recrutement en monocytes Ly6C^{hi} (Soehnlein *et al.* 2008). L'adhérence et la transmigration des monocytes diffèrent de celle des neutrophiles. Pour les neutrophiles, en simplifiant, l'expression d'intégrine MAC-1 se liant à la P-sélectine, ICAM 1 et 2 suit la chimioattraction par C5a, LTB4 et CXCL8. Si les monocytes expriment aussi les β 1-intégrines ils interagissent préférentiellement avec VCAM1 et la E-selectine sous l'attraction de CCL-2. Autre particularité qui est une clé de compréhension du timing de recrutement des leucocytes avec une première vague de neutrophiles puis de monocytes est le rôle de la sécrétion du récepteur soluble de l'IL-6 (sIL6-R). L'sIL6-R complexée à l'IL-6 modifie le profil des chimiokines sécrétées par les cellules endothéliales et favorise le recrutement des monocytes (Hurst *et al.* 2001). Par ailleurs la protéinase 3 active les cellules endothéliales qui sécrètent alors du CCL-2 (Taekema-Roelvink *et al.* 2001). L'azurocidine quand à elle provoque la sécrétion de CCL3 par les macrophages qui via CCR1 recrute les monocytes inflammatoires (Pahlman *et al.* 2006). Enfin les sérines protéases du neutrophiles peuvent cliver les chimiokines CCL6, CCL9, CCL15, CCL23 et ainsi augmenter d'un facteur 1000 leur capacité d'activation de CCR1 (Berahovich *et al.* 2005), elles peuvent aussi cliver la pro-chimérine en chimérine chimioattractant des macrophages, monocytes et des cellules dendritiques plasmacytoïdes (Wittamer *et al.* 2003). Les neutrophiles eux-mêmes peuvent sécréter du CCL3, CCL4 et du CXCL8 avec une activation autocrine (Gerszten *et al.* 1999). Nous avons résumé dans le tableau I.4 les différentes molécules impliquées dans le recrutement des monocytes.

2.6. Initiation de la résolution

Nous avons détaillé l'initiation et le recrutement des cellules impliquées dans la réponse inflammatoire. Cette réaction est basée sur la collaboration entre neutrophiles, monocytes inflammatoires et macrophages qui constituent le système myéloïde phagocytaire spécialisé dans la lutte contre les microbes intracellulaires et extracellulaires (Silva 2010). Lorsque la menace a été contrôlée le processus inflammatoire doit cesser et une phase de réparation doit s'engager. Cette phase de résolution de l'inflammation est un processus actif que nous allons maintenant détailler. Ce processus comporte un changement dans le profil lipidique local, la libération de molécules constituant des signaux pro-résolutifs (comme l'Annexine

A1), une inactivation des chimiokines. Mais les deux étapes clés de ce processus est le contrôle de la survie du neutrophile et la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages (efferocytose).

Tableau I.4 : Principales molécules impliquées dans le recrutement des monocytes (d'après Shi & Pamer 2011)

Molécules exprimées sur le monocyte	Ligands	Fonctions
Chimiokines et leurs récepteurs		
CCR2	CCL2, CCL7, CCL12	Emigration des monocytes Ly6C ^{hi} de la moelle osseuse
CX3CR1	CX3CL1	« Patrolling »
CCR1, CCR5	CCL3, CCL5	Recrutement sur le site inflammatoire
CCR6	CCL20	Migration des monocytes Ly6C ^{hi}
Molécules d'adhésion		
L-selectine	CD34, GLYCAM1, MADCAM1	Accrochage , roulement sur endothélium
PSGL-1	P-sélectine, E-sélectine	
LFA-1	ICAM1	« Patrolling » des monocytes CX3CR1 ^{hi} Ly6C ^{lo}
MAC1	ICAM1	Adhésion lors inflammation
VLA4	VCAM1	Adhésion sur endothélium inflammatoire
PECAM1	PECAM1	Transmigration

2.6.1. Modification des médiateurs lipidiques

Nous avons décrit précédemment le rôle des prostaglandines et leucotriènes comme médiateurs de l'inflammation. Ces médiateurs sont aussi responsables d'un phénomène de changement de classe des médiateurs lipidiques ('Class-switch'). En effet les prostaglandines E2 et D2 impliquées dans la vasodilatation provoquent la production à partir de lipides dérivés de l'acide arachidonique de lipoxines A4 en lieu et place des leucotriènes B4. Ceci ouvre la voie à la production des résolvines D et E et des protectines (Serhan *et al.* 2008). Ces médiateurs lipidiques anti-inflammatoires sont sécrétés par les neutrophiles et les macrophages mais aussi les plaquettes. Ces molécules ont de multiples fonctions dirigées contre les différents effecteurs de la réaction inflammatoire que nous avons résumée dans le tableau I.5. L'action de la lipoxine A4 passe par sa liaison à son récepteur ALX (bloquant la

migration des neutrophiles et activant les monocytes/macrophages). La résolvine E1 est reconnue par le récepteur ChemR23 à la surface des monocytes, macrophages et cellules dendritiques et antagonise le récepteur BLT1 sur les neutrophiles les rendant insensibles à la liaison de LTB4 (Arita *et al.* 2007). La famille des lipides pro-résolutifs s'est récemment agrandie avec la famille des marésines favorisant le recrutement des macrophages et diminuant celui des neutrophiles (Serhan *et al.* 2009).

Tableau I.5 : principales fonctions des médiateurs lipidiques anti inflammatoires (adapté de Serhan *et al.* 2008, El Kebir *et al.* 2012)

Médiateur	Cibles	Fonctions
Lipoxine A4	Leucocytes	Diminue l'expression CD11b/CD18 Prévient le clivage de la L-selectine
	Neutrophiles	Stoppe la chimiotaxie, l'adhésion, la transmigration Bloque la production de $H_2O_2^{*-}$
	Macrophages	Favorise l'efferocytose Diminue la sécrétion de CXCL8
	Lymphocytes T	Inhibe la sécrétion de TNF- α Accroît l'expression de CCR5
	Cellules dendritiques	Bloque la production d'IL-12
	Cellules endothéliales	Bloque la production de ROS
Résolvine D1	Neutrophiles	Bloque la transmigration
Résolvine E1	Neutrophiles	Stoppe la transmigration Induit l'apoptose
	Macrophages	Favorise l'efferocytose
	Cellules dendritiques	Bloque la production d'IL-12
	Lymphocytes T	Accroît l'expression de CCR5
Protectine D1	Neutrophiles	Accroît l'expression de CCR5
	Apoptotiques	
	Macrophages	Favorise l'efferocytose
	Lymphocytes T	Inhibe la sécrétion de TNF- α et INF- γ Accroît l'expression de CCR5

2.6.2. Signaux pro-résolutifs

L'annexine A1 est une protéine présente dans les neutrophiles, monocytes et macrophages qui peut être sécrétée après activation de ces cellules. Elle peut aussi se transloquer à la membrane du neutrophile après activation où elle va interagir avec FPR2 ce qui résultera en une diminution des capacités d'adhésion et de migration (Perretti *et al.* 1996). L'annexine A1 sécrétée favorise l'apoptose des neutrophiles (Perretti & Solito 2004), apoptose des

neutrophiles qui est aussi associée à une sécrétion d'Annexine A1 qui favorise leur phagocytose par les macrophages (Scannell *et al.* 2007). Une autre molécule sécrétée par de nombreuses cellules apoptotiques possède des fonctions similaires, il s'agit de la lactoferrine qui peut être sécrétée par des neutrophiles apoptotiques. Cette protéine bloque la migration des neutrophiles en empêchant le remodelage de leur cytosquelette (Bournazou *et al.* 2009). Toutefois cette protéine a aussi été montrée comme favorisant la survie des neutrophiles dans le liquide synovial de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde dans un mécanisme dépendant de sa saturation en fer (Wong *et al.* 2009, Francis *et al.* 2011). La chémérine est une chimiokine attirant les cellules présentatrices de l'antigène, mais les peptides issus de sa partie C-terminale sont de puissants inhibiteurs du recrutement des neutrophiles et monocytes (Cash *et al.* 2008) mais aussi des promoteurs de la clairance des neutrophiles apoptotiques par les macrophages (Cash *et al.* 2010).

2.6.3 Inactivation des chimiokines

Un des mécanismes permettant d'arrêter le processus inflammatoire est d'inactiver ou de retirer les principaux médiateurs de recrutement et d'activation que sont les chimiokines. C'est le rôle d'une metalloprotéase du macrophage MMP12 qui clive les chimiokines de type CXC ayant un motif ELR nécessaire à la liaison à leur récepteur. MMP12 clive aussi CCL2, 7, 8 et 13 qui se fixent encore sur leurs récepteurs (CCR1, CCR2, CCR3) mais se comportent alors comme des antagonistes limitant le recrutement des neutrophiles (Dean *et al.* 2008). MMP1 et MMP3 sont capables de fonctions similaires sur CCL2, CCL8 et CCL13 (McQuibban *et al.* 2002). Les médiateurs lipidiques pro-résolutifs résolvine E1 et protectine D1 sont capables d'augmenter l'expression de CCR5 à la surface des neutrophiles apoptotiques (tardifs) qui joue le rôle de « pompe » vis-à-vis des chimiokines CCL3 et CCL5 par exemple (Ariel *et al.* 2006). Cette fonction des neutrophiles apoptotiques comme la sécrétion d'Annexine A1 ou de lactoferrine est un des mécanismes par lequel la mort du neutrophile influence la résolution de l'inflammation. La régulation de la survie du neutrophile représente donc un enjeu majeur auquel nous allons maintenant nous intéresser.

2.7 Vie et mort du neutrophile

Les neutrophiles représentent la population majoritaire des leucocytes chez l'homme. Chaque jour $5 \cdot 10^{10}$ à 10^{11} neutrophiles sont produits dans la moelle. Le même nombre de neutrophile engage donc dans le même temps un programme de mort programmée

(apoptose) pour maintenir l'homéostasie (Athens *et al.* 1961). La production de neutrophiles dans la moelle est sous la dépendance du G-CSF qui oriente les cellules souches hématopoïétiques (CSH) vers la lignée myéloïde, induit la prolifération des précurseurs myéloïdes et favorise la libération des cellules matures dans la circulation en interférant avec l'axe CXCR4-SDF-1 (Summers *et al.* 2010). L'injection de neutrophiles marqués révèle que la moitié d'entre eux disparaissent de la circulation très rapidement (Mauer *et al.* 1960). L'explication de ce phénomène est l'existence d'un phénomène de margination. La mobilisation rapide de ces neutrophiles par adrénaline ou glucocorticoïdes met en évidence l'existence d'un pool marginé dont la nature exacte est débattue. Il est probable qu'il s'agisse de neutrophiles « piégés » dans des capillaires difficiles à quitter en raison de contraintes mécaniques (Wiggs *et al.* 1994). Les sites anatomiques susceptibles d'être concernés sont le foie, la rate et la moelle osseuse pour lesquels le temps de transit des neutrophiles est plus long qu'attendu comparé à un écoulement libre, l'importance du pool marginé dans le poumon est l'objet d'une controverse (Summers *et al.* Immunology 2010). La durée de vie d'un neutrophile circulant, qui ne prolifère pas, est l'objet d'une intense controverse depuis la publication d'un travail rapportant une demi-vie de 90 h en utilisant un marquage à l'eau lourde (Pillay *et al.* 2010). En effet jusqu'à cette publication la demi-vie des neutrophiles circulants était estimée à quelques heures. Les principales études sur lesquelles reposait l'estimation de la demi-vie du neutrophile circulant utilisaient un marquage ex-vivo des neutrophiles puis une réinjection. Les temps trouvés variaient peu de 5 à 9h sauf pour le marquage au ^{51}Cr qui donnait une demi-vie de 17.5 h (Tak *et al.* 2013). Malheureusement l'isolement des neutrophiles est souvent associé à une activation de ceux-ci et à une modification de leur homing après réinjection ce qui rend l'estimation de leur demi-vie à partir des neutrophiles circulants difficile (Watson *et al.* 1992). Les études récentes et notamment celle basée sur l'injection d'eau lourde qui permet l'incorporation de deutérium au niveau de l'ADN qui peut être ensuite détecté par spectrométrie de masse ne permet pas de trancher. En effet cette méthode ne permet pas de savoir si la demi-vie mesurée est celle des neutrophiles matures circulants ou bien leurs progéniteurs (Li *et al.* 2011). Si la demi-vie du neutrophile en régime homéostatique se révèle difficile à étudier, on connaît toutefois beaucoup de facteurs modifiant la survie du neutrophile durant un processus inflammatoire. Il faut toutefois noter que la plupart de ces facteurs ont été étudiés *in vitro*, et que les travaux essayant de mesurer la demi-vie *in vivo* des neutrophiles

en contexte inflammatoire sont sujettes aux limites précédemment décrites. Les principaux facteurs de survie auxquels le neutrophile peut être exposé sur un site inflammatoire sont reportés dans le tableau I.6, en plus de ces facteurs on peut rajouter que lors de l'extravasation l'interaction avec VCAM-1 à la surface de la cellule endothéliale via l'intégrine $\alpha_9\beta_1$ joue un rôle anti-apoptotique (Ross *et al.* 2006).

Tableau I.6 : Principaux facteurs de survie du neutrophile humain (adapté de Geering *et al.* 2013)

Facteur de Survie	Sources
Cytokines	
IL1- β	Macrophages, PMN, DC
IL-2	Th1
IL-4	Th2, Eosinophiles, basophiles
IL-8	Cellules épithéliales, macrophages, PMN
TNF- α (<10pg/mL)	Th1, Th17, LT CD8, Macrophages, PMN
Facteurs de croissance/hormones	
G-CSF	Cellules endothéliales, macrophages
GM-CSF	T CD4, T CD8, Th17, NK, macrophages
Leptine	Non hematopoietiques
Médiateurs lipidiques	
LTB4	Macrophages, PMN, Mastocytes, LB
PAMP	
fMLF (FRP1)	Bactérie
LPS (TLR4)	Bactérie Gram negative
Acide propanoïque ou butyrique	Bactérie
Modulines	Bactérie
Acide lipoteichoïque (TLR2)	Bactérie Gram positif
Shiga toxine	<i>E. Coli</i>
Pam3CSK4 (TLR2)	Bactérie Gram negative
Flagelline (TLR5)	Bactérie
Peptidoglycane	Bactérie
CpG non methyl (TLR9)	Bactérie
ARN simple brin (TLR8)	Virus
DAMP	
HMGB1 (TLR2/4)	Cellule du soi endommagée
S100A8/A9 (TLR4)	Cellule du soi endommagée
ATP	Cellule du soi endommagée
Acide urique	Cellule du soi endommagée
Pathogènes	
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	
<i>Francisella tularensis</i>	
Autres	
Hypoxie	
Acidité	

Un facteur habituellement cité comme permettant la survie des neutrophiles est l'exposition aux glucocorticoïdes permettant parfois d'expliquer l'inefficacité de cette classe thérapeutique dans des pathologies inflammatoires par exemple pulmonaires (bronchopathie pulmonaire chronique obstructive). Si ce résultat est démontré pour une étude *in vitro* (Meagher *et al.* 1996), il semble que dans un contexte inflammatoire associé avec une hypoxie les glucocorticoïdes ne soient plus capables de favoriser la survie des neutrophiles (Marwick *et al.* 2013).

Le mécanisme de destruction des neutrophiles circulants n'est pas connu avec précision, mais les études de radio marquages indiquent que les sites de fixation sont la moelle osseuse, le foie et la rate (Furze *et al.* 2008). L'apoptose des neutrophiles est induite par l'absence de facteurs pro-survie, par la liaison de récepteurs de mort ou encore après phagocytose de pathogènes. Nous avons regroupé les principaux facteurs de mort connus pour le neutrophile humain dans le tableau I.7.

Tableau I.7 : Principaux facteurs de mort du neutrophile humain (adapté de Geering *et al.* 2013)

Facteurs de mort	Sources
Cytokines	
TNF- α (> 10pg/mL)	Th1, Th17, T CD8, macrophages, PMN
FasL	LT, macrophages, DC, cellules non hématopoïétiques
TRAIL	LT, NK, DC, PMN
Phagocytose (via la production de ROS)	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	
<i>Burkholderia cepacia</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i> (débattu)	
<i>Entamoeba histolytica</i>	
<i>Influenza A</i>	
Endotoxines	
Pyocianine	Bactérie
Leucotoxine	Bactérie
Autres	
CD44	Matrice extracellulaire
Siglec 9	Matrice extracellulaire

En l'absence de facteurs de survie les neutrophiles engagent un programme de mort dit intrinsèque. Le signal intracellulaire déclenchant ce mécanisme n'est pas connu mais le rôle des espèces réactives de l'oxygène (ROS) produite par la NADPH oxydase n'est plus à démontrer (Geering *et al.* 2011a). Ce fait est illustré par la survie prolongée des neutrophiles de patients atteints de granulomatose septique chronique (déficience fonctionnelle de la NADPH oxydase). D'un point de vue moléculaire l'apoptose intrinsèque semble associée à deux événements : d'une part la dépolarisation mitochondriale qui mène à la libération de cytochrome C qui va former la plateforme d'activation caspase9/caspase3 (Murphy *et al.* 2003) et d'autre part la perméabilisation des granules qui permet la libération de la cathepsine D qui clive et active la caspase 8 (Conus *et al.* 2008). L'apoptose extrinsèque peut résulter de la liaison de TNF- α à TNFR1, de TRAIL à TRAIL-R ou bien de FasL à Fas/CD95 qui résultera en l'activation de la caspase 8 puis de la caspase 3. Le cas du TNF- α est particulièrement instructif car l'effet est dose dépendant, il semble qu'à faible dose la production minimale de ROS soit associée à une survie alors qu'à doses importantes la production de ROS entraînera l'apoptose dans un mécanisme caspase dépendant (Geering *et al.* 2011b). La production de ROS induite semble de même être à l'origine de l'induction d'apoptose à la suite de la phagocytose de pathogènes (Geering *et al.* 2011a). Des travaux récents ont montré que la survie du neutrophile était étroitement liée à la présence de Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) dans son cytosol (Witko-Sarsat *et al.* 2010a). Comme son nom l'indique, PCNA est une protéine nucléaire indispensable à la réplication et la réparation de l'ADN et il ne lui avait jamais été attribué de fonctions cytoplasmiques dans une cellule qui ne prolifère pas comme le neutrophile. L'identification d'une séquence d'export nucléaire (ou nuclear export sequence, NES) dans la séquence de PCNA a apporté la preuve que cet export nucléaire peut s'effectuer de façon régulée, en particulier en fin de différenciation granulocytaire (Bouayad *et al.* 2012). Dans le neutrophile mature, PCNA cytosolique inhibe son apoptose en séquestrant les procaspases (procaspase-3; -8, -9 et -10) (Witko-Sarsat *et al.* 2011). Cependant, son rôle pro-survie ne se limite pas à une inhibition des processus de mort cellulaire et il a été proposé que le "réseau" de protéines associées à PCNA permette la survie en maintenant un état de repos et en intégrant des signaux métaboliques (De Chiara *et al.* 2012). Il semblerait donc que PCNA soit un élément majeur dans la balance survie/apoptose du neutrophile tant en condition homéostatique qu'en condition inflammatoire.

Une forme particulière de mort du neutrophile a été décrite récemment il s'agit de la NETosis. Les NET (Neutrophils Extracellular Traps) sont composés d'ADN, d'histone et de composants des granules relargués par les neutrophiles dans un but décrit comme antibactérien dans l'étude 'princeps' (Brinkmann *et al.* 2004). Les premières études associaient la formation des NET à une mort du neutrophile dans un mécanisme dépendant d'une NADPH oxydase fonctionnelle (Fuchs *et al.* 2007), de la présence d'elastase et de la myelopéroxydase (Papayannopoulos *et al.* 2010) ainsi que de la citrullination des histones (Li *et al.* 2010). Très vite une controverse s'est installée concernant les NET. Plusieurs points de discordance sont actuellement discutés. Le premier concerne leur fonction en effet si la description initiale suggère un rôle bactéricide des NET révélant un nouveau mécanisme de la première ligne de défense que sont les neutrophiles des travaux récents remettent en doute le caractère bactéricide des NET (pour *S. aureus* et *C. albicans* par exemple) et concèdent au mieux un rôle bactériostatique (Menegazzi *et al.* 2012). On peut donc se demander si cette fonction est vraiment importante *in vivo* en comparaison du pouvoir phagocytaire des neutrophiles (Nauseef 2012). Un autre point concerne la méthodologie de génération des NET *in vitro* (habituellement du PMA) et la relevance physiologique de cette génération, enfin leur identification peut être problématique en microscopie électronique étant donné que la fibrine n'est pas distinguable des NET par cette technique (Krautgartner *et al.* 2010). De plus l'association des NET avec la mort du neutrophile a été remise en question *in vitro* dans une étude montrant que les neutrophiles (mais aussi les éosinophiles et basophiles) pouvaient relarguer de l'ADN mitochondrial sans que cela ne soit associé à la mort du neutrophile (Yousefi *et al.* 2009). De manière intéressante une étude faite *in vivo* dans un contexte infectieux à bactérie gram positif (Figure I.7) a montré que les neutrophiles étaient capables de faire des NET et de devenir anucléés tout en gardant leur capacité bactéricide mais cette fois-ci par phagocytose (Yipp *et al.* 2012). Si l'implication des NET dans différentes pathologies ne cesse d'être rapportée il semble nécessaire de préciser la spécificité et le rôle exact de ce processus dans la physiologie du neutrophile.

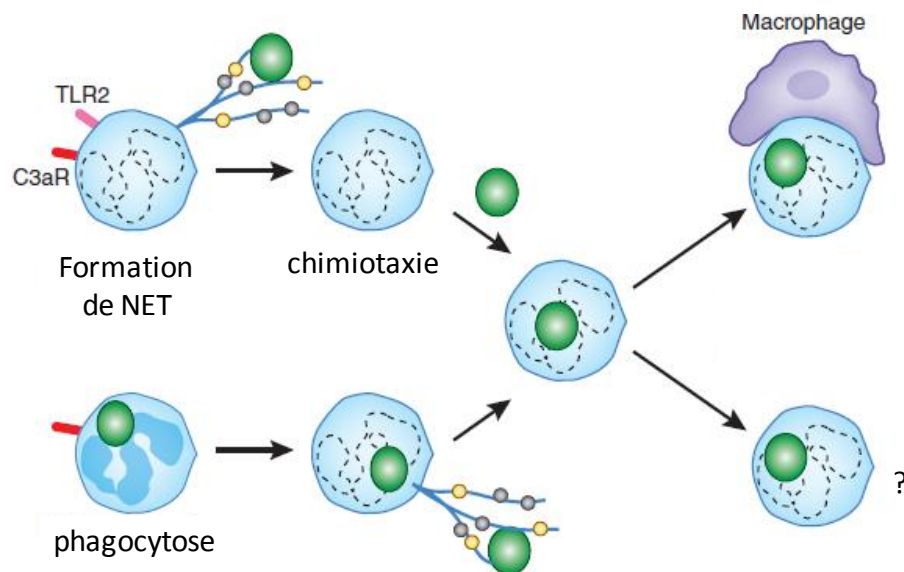


Figure I.7 : Description d'un phénomène non lytique antibactérien du neutrophile médié par TLR2 et le récepteur du complément 3a (C3aR). La formation de NET n'ôte pas au neutrophile ses capacités de migration et de phagocytose. Les bactéries phagocytées sont aussi maintenues en intra-cellulaire. Le devenir de ces neutrophiles anucléés post formation de NET n'est pas connu mais la phagocytose de ces cellules par des macrophages est probable (adapté de Peschel & Hartle 2012)

D'autres types de mort ont été décrites : la nécrose primaire, la nécrose secondaire ou encore l'autophagie. La nécrose primaire qui correspond à la perte de l'intégrité de la membrane plasmique et la destruction de la cellule a longtemps été décrite comme une mort non spécifique. Cependant récemment il a été montré que la nécrose peut se faire dans le cadre d'une mort programmée appelée necroptose impliquant les kinases RIP1 et RIP3 en réponse à des stimuli comme le TNF- α ou des agonistes de TLR (Han *et al.* 2011). La nécrose secondaire survient quand à elle après l'apoptose, d'où son nom, lorsque la clairance des cellules apoptotique est inefficace quelle qu'en soit la raison. La mort par autophagie est un oxymore, l'autophagie étant un mécanisme de survie. Néanmoins certaines cellules s'engagent dans une mort cellulaire dans lesquels le processus d'apoptose est bloqué et un processus autophagique accompagne plus qu'il ne provoque cette mort. Peu de travaux ont étudié la « mort autophagique » chez le neutrophile mais la stimulation par TNF ou via les TLR peut être associée à l'agrégation de complexes LC3 avec formation de vacuoles évoquant l'autophagie (Geering *et al.* 2011a).

2.8. Restauration de l'homéostasie

La clairance des neutrophiles apoptotiques est un processus complexe fondamental de la phase de résolution de l'inflammation. Nous étudierons en détail ce phénomène dans la partie II. Nous allons ici nous intéresser aux conséquences de l'efferocytose. Les macrophages qui sont présents sur le site inflammatoire et qui phagocytent des neutrophiles apoptotiques modifient leur profil de sécrétion en médiateurs. D'un profil pro-inflammatoire que nous avons précédemment décrit composé de cytokines et de médiateurs lipidiques, ils développent un programme transcriptionnel résultant dans la sécrétion de médiateurs anti-inflammatoires dont le TGF- β (Fadok *et al.* 1998b). S'associe à cette sécrétion la sécrétion d'autres médiateurs comme la lipoxine A4 ou encore le VEGF fondamental pour la réparation tissulaire (Soehnlein *et al.* 2010). Ces macrophages pro-résolutifs migrent vers les ganglions lymphatiques pour y jouer leur rôle de cellule présentatrice de l'antigène (Bellingan *et al.* 1996), sécrètent des chimiokines attirant les lymphocytes T et B comme CXCL1, CCL5 ou encore CXCL13. En conséquence il a été montré dans un modèle murin d'inflammation péritonéale que les populations lymphocytaires qui occupent alors le site B1, B2, NK, $\gamma\delta$, $CD4^+CD25^+$ participent à la protection envers une éventuelle nouvelle infection et non à la résolution en propre, mécanisme illustré par le fait que les souris RAG-/- avait une mortalité accrue face à une infection bactérienne mais une résolution normale lors d'une inflammation stérile (Rajakariar *et al.* 2008). Un autre mécanisme de régulation participant à la résolution est l'inhibition de la voie IL-23/IL-17 au cours de l'efferocytose. En effet les macrophages sont des producteurs d'IL-23 qui contrôle la sécrétion d'IL-17 par les lymphocytes $\gamma\delta$ et des NKT non conventionnels de type CD4-T $\alpha\beta$ (Stark *et al.* 2005). Ces populations s'ajoutent au T $CD3^{hi}CD4^+TCR\alpha\beta$ (Th17) activés qui sont une source majeure lymphocytaire d'IL-17. Or l'IL-17 agit sur les cellules stromales de la moelle osseuse qui produisent alors du G-CSF qui provoque la prolifération des précurseurs myéloïdes et la libération des neutrophiles dans la circulation (Nathan 2006). Or la phagocytose de neutrophiles apoptotiques par les macrophages inhibe la sécrétion d'IL-23 et donc participe à la baisse du recrutement de neutrophile le site inflammatoire (Stark *et al.* 2005). Les macrophages sont des éléments clés de la restauration fonctionnelle du tissu. Les macrophages décrits comme alternativement activés (type M2) ont été démontrés comme fondamentaux dans la réparation cutanée après une atteinte mécanique (Lucas *et al.* 2010) ou bien dans la régénération musculaire (Saclier *et al.* 2013). Les facteurs favorisant la

réparation sont le TGF- β qui favorise la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes qui peuvent sécréter du collagène fibrillaire, les cytokines anti-inflammatoires IL-10 et IL-1RA, des facteurs de croissances. Les macrophages sont aussi fondamentaux dans le contrôle de la matrice extracellulaire digérant le collagène pour permettre son turn-over naturel phénomène qui lorsqu'il est contrarié conduit à une résolution de l'inflammation défectueuse et un processus fibrotique (Atabai *et al.* 2009).

Si les neutrophiles et les macrophages sont probablement les cellules clés de la phase de résolution de l'inflammation d'autres populations de cellules peuvent jouer un rôle important. C'est le cas des lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ qui sont des producteurs de TGF- β et d'IL-10 et qui peuvent participer à la résolution de l'inflammation dans un processus indépendant de l'inhibition de la réponse T à un antigène (D'Alessio *et al.* 2009). La reconnaissance de l'implication des MDSC (Myeloid-derived suppressor cells) va probablement s'accroître au cours des prochaines années notamment en raison de leur rôle dans l'expansion des populations de cellules T régulatrices (Serafini *et al.* 2008).

PARTIE II : Clairance des cellules apoptotiques

Plus de 10^{11} cellules meurent chaque jour dans un organisme multicellulaire mammifère or la détection de cellules mortes dans un tissu normal est rare (Elliott & Ravichandran 2010). La mort cellulaire programmée ou apoptose est un phénomène ubiquitaire jouant un rôle déterminant lors du développement, de la maintenance d'un tissu ou lors d'une agression tissulaire de type virale ou bactérienne intracellulaire par exemple. La clairance de ces cellules apoptotiques est réalisée par des cellules professionnelles (comme les macrophages) ou par des cellules non professionnelles pour cette tâche qui sont les cellules formant le voisinage de la cellule apoptotique. La répartition des tâches entre les différents types cellulaires n'est pas parfaitement comprise mais le comportement palpatoire et la cinétique de phagocytose diffèrent grandement entre ces deux catégories (Parnaik *et al.* 2000). Comme l'apoptose ne se limite pas à une perte cellulaire, pour maintenir l'homéostasie d'un tissu le remplacement cellulaire et le recyclage des ressources intracellulaires est nécessaire, un phénomène régulé prend donc place. Nous allons détailler ce phénomène de clairance des cellules apoptotiques en séparant artificiellement les mécanismes connus de la reconnaissance et de la phagocytose de la cellule apoptotique et d'autre part les conséquences sur le macrophage et le système immunitaire de manière plus général.

1. Les Différentes phases

Le phénomène de clairance d'une cellule apoptotique est généralement décrit en phase au cours de laquelle la cellule apoptotique signale sa présence en sécrétant des signaux « find-me » en vue du recrutement des phagocytes professionnels puis elle exprime à sa surface des signaux de reconnaissance « eat-me » qui engage la phagocytose. Suit la dégradation de la cellule phagocytée dans le phagolysosome et enfin la sécrétion par le macrophage de cytokines. Nous allons décrire chacune de ces phases (Figure II.1).

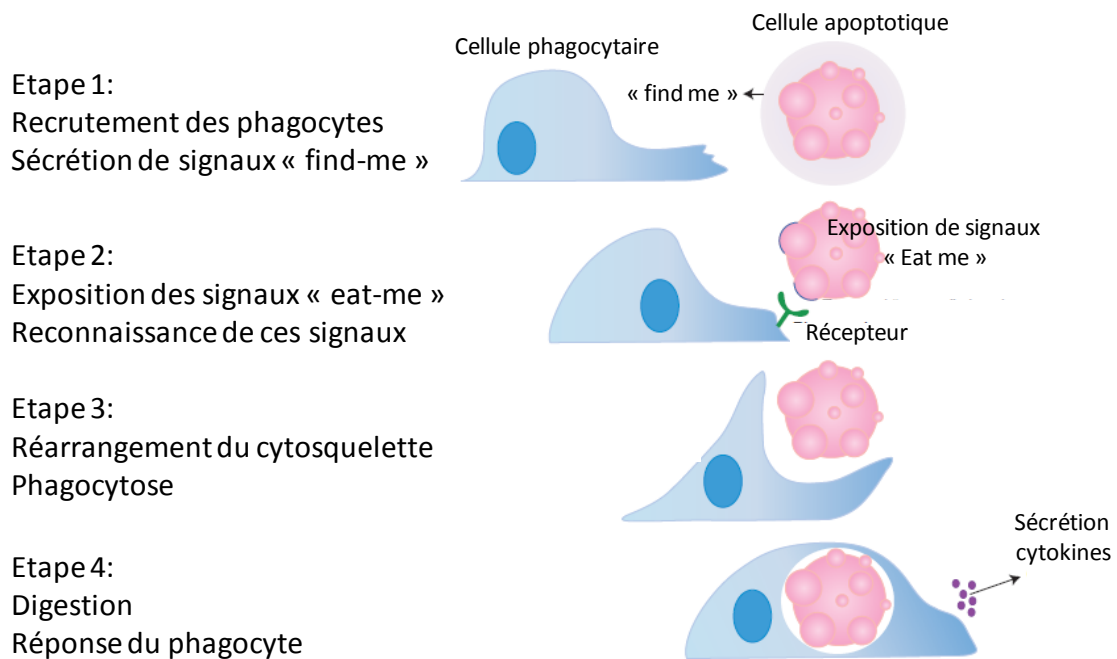


Figure II.1 : La clairance d'une cellule apoptotique peut se décomposer en quatre phases. La cellule apoptotique sécrète dans un premier temps des signaux « find-me » qui vont permettre le recrutement des phagocytes. L'exposition de signaux « eat-me » vont permettre la reconnaissance de ces cellules via des récepteurs spécialisés sur la surface des phagocytes. Survient ensuite la phagocytose puis la digestion, ce qui résulte en une réponse du phagocyte via la sécrétion de médiateurs (d'après Hochreiter-Hufford & Ravichandran 2013).

1.1 Etape 1 : Signaux "Find me"

Le rôle attribué à ces signaux est d'établir un gradient chimique permettant aux phagocytes de se diriger vers la cellule apoptotique. Plusieurs facteurs ont été proposés dans la littérature pour jouer ce rôle : la fractalkine (CX₃CL1), la lysophosphatidylcholine (LPC), la sphingosine-1-phosphate (S1P) et les nucléotides ATP et UTP. Les données expérimentales sous tendant cette liste ne sont toutefois pas sans limites, et c'est ce que nous allons discuter. Concernant la fractalkine, cette chimiokine est sécrétée par les lymphocytes B apoptotiques et les neurones. Elle recrute les macrophages en se liant à son récepteur CX₃CR1 (Truman et al Blood 2008). Ce résultat est basé sur l'observation suivante: dans les centres germinatifs le taux élevé de lymphocytes B apoptotiques durant le processus de maturation d'affinité est associé à un recrutement de macrophages dépendant du couple fractalkine/CX₃CR1. Néanmoins les souris déficientes CX₃CR1 ne présentent pas

d'accumulation de cellules apoptotiques ou de cellules nécrotiques dans les centres germinatifs. Etant donné le nombre restreint de cellules sécrétant de la fractalkine, ces données ne permettent donc pas de lui attribuer un rôle général dans la clairance des cellules apoptotiques. Le LPC est sécrété par les cellules apoptotiques de manière consécutive à l'activation de la phospholipase A2 dans un mécanisme qui est caspase-3 dépendant (Lauber *et al.* 2003). Seulement la concentration nécessaire de LPC pour activer le récepteur couplé aux protéines G G2A est élevée (20-30 μ M), de plus le LPC est un lipide ubiquitaire du plasma ce qui en fait un candidat peu probable pour la chimio attraction de macrophages (Nagata *et al.* 2010). La S1P est quand à elle produite par la sphingosine kinase sous la dépendance des caspases et provoque l'attraction des macrophages en se liant à son récepteur S1P-R sur les macrophages (Gude *et al.* 2008). Mais, de manière similaire au LPC, ce lipide est aussi présent dans la circulation ce qui limite son action à un recrutement local au mieux. Les nucléotides ATP et UTP sont sécrétés par les cellules apoptotiques à travers un canal pannexine ouvert par le clivage de leur partie C-terminale de manière caspase dépendante (Chekeni *et al.* 2010). Ces nucléotides sont reconnus par le récepteur P2Y2 ce qui a été démontré expérimentalement par l'accumulation de thymocytes apoptotiques dans le thymus de souris P2Y2^{-/-} traitées par corticoïdes (Elliott *et al.* 2009). Toutefois ce signal ne peut avoir qu'une portée locale étant donné la dégradation rapide des nucléotides en extra-cellulaire par les nucléotidases présentes. D'autre part la quantité sécrétée au cours de l'apoptose ne représente pas plus de 2% du stock intracellulaire, quantité négligeable comparée à l'apport extracellulaire libéré au cours de la nécrose, ce qui pose le problème de la reconnaissance de ce signal par les phagocytes (Ravichandran 2010). Une difficulté qui se présente pour les molécules dont nous venons de parler est que le LPC, la S1P ou encore les nucléotides sont des chimio-attractant de neutrophiles (Chen *et al.* 2006 ; Florey *et al.* 2009). Il faut donc justifier dans ce cas l'absence d'infiltration systématique de neutrophiles dans les tissus en fonctionnement même normal. L'hypothèse proposée pour expliquer ce fait est la possibilité pour les cellules apoptotiques de sécréter des molécules inhibant le recrutement de neutrophiles, ce serait un signal « step away ». Une des molécules proposées pour ce rôle est la lactoferrine qui inhibe la migration des neutrophiles et est sécrétée par les cellules apoptotiques (Bournazou *et al.* 2009). Les limites que nous venons de décrire nous pousse à nous interroger sur le rôle exact des ces signaux « find me » et de poser la question d'une part de leur réelle nécessité mais aussi de la possibilité d'autres

fonctions que celle du recrutement de phagocytes. En effet toutes les cellules apoptotiques ne nécessitent pas la présence de macrophages pour être phagocytées, chez le ver *Caenorhabditis elegans* la clairance des cellules apoptotiques est prise en charge par les cellules voisines (Kinchin *et al.* 2005). A contrario, dans le cas des thymocytes apoptotiques, les autres thymocytes étant dépourvus de capacité phagocytaire, l'intervention de phagocytes professionnels s'impose. Une possibilité est que ces signaux « find me » jouent un rôle de facilitateur de la reconnaissance des cellules apoptotiques plus que d'attraction. En effet la fractalkine est capable de déclencher l'expression de MGF-E8 (Milk fat Globule EGF factor 8) par les macrophages péritonéaux, or il s'agit d'une molécule de pontage impliquée dans la reconnaissance des cellules apoptotiques (Miksa *et al.* 2007). Le LPC est aussi une cible membranaire des IgM sur les cellules apoptotiques et favorise leur phagocytose (Kim *et al.* 2002). On peut donc proposer que ces signaux jouent un rôle facilitateur dans la captation des cellules apoptotiques, d'autant plus que l'association de ces différents signaux n'a pas été étudiée expérimentalement.

1.2 Etape 2 Signaux « Eat me »

Il est nécessaire pour une cellule phagocytaire de reconnaître une cellule apoptotique pour éviter la phagocytose d'une cellule viable. La liste des molécules exprimées à la surface des cellules apoptotiques permettant cette reconnaissance (signaux « eat me ») ne cesse d'augmenter ainsi que celle de leurs récepteurs sans compter les molécules d'adaptation (« bridging molecules »). On peut représenter ces différentes molécules sur un « superphagocyte » exprimant tous les récepteurs ainsi qu'une cellule apoptotique exprimant tous les « eat-me » comme sur la figure II.2.

Les différents couples de signaux « Eat-me » et leurs récepteurs comprennent parmi d'autres (Devitt & Marshall 2011): les lectines qui reconnaissent des sucres altérés (Ezekowitz *et al.* 1990), le CD36 associé aux intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ qui reconnaissent la thrombospondine (Savill *et al.* 1990), le LRP (CD91) qui associé en trans à la calréticuline reconnaît la calréticuline en cis et le C1q (Ogden *et al.* 2001 ; Gardai *et al.* 2005), le CD14 qui reconnaît ICAM3 (Gregory *et al.* 1998) et le récepteur scavenger qui reconnaît le LDL oxydé (Gordon 1999).

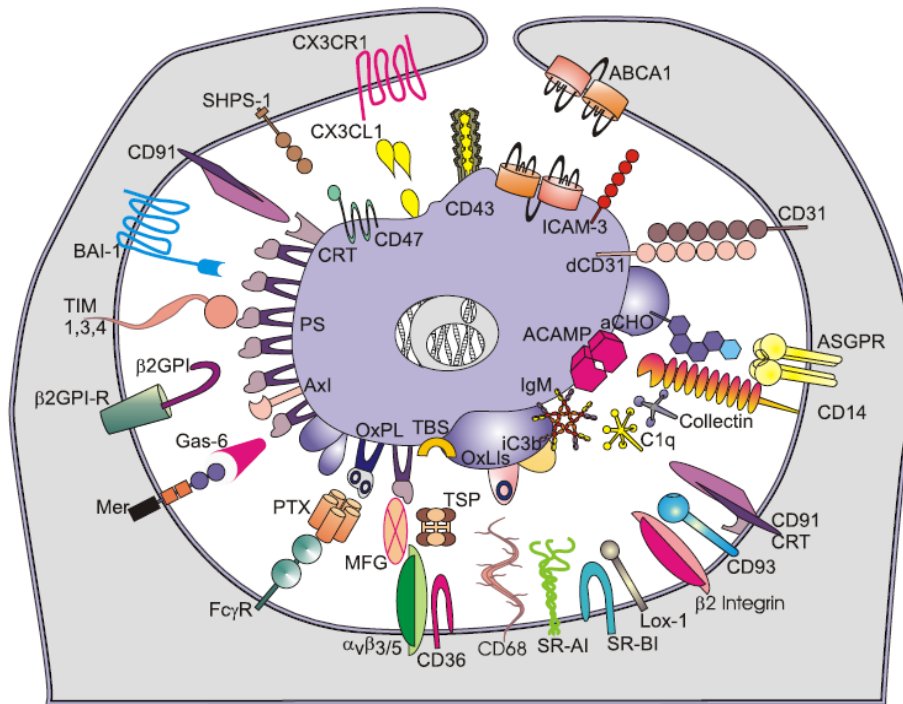


Figure II.2 : Les molécules impliquées dans la reconnaissance des cellules apoptotiques par les phagocytes mais aussi dans l'inhibition de celle-ci. Ces molécules ne sont pas toutes présentes sur la même cellule. Il s'agit d'une représentation artificielle permettant d'illustrer la complexité et la variété des molécules mises en jeu. β_2 GPI-R : β_2 glycoprotein I receptor, ABCA1 : ATP-binding cassette transporter 1, aCHO : altered carbohydrates, ASGPR : asialoglycoprotein receptor, BAI-1 : brain-specific angiogenesis inhibitor 1, CRT : calreticulin, dCD31 : disabled CD31, OxLLs : oxidized LDL-like site, OxPL : oxidized phospholipids, SHPS-1 : Src homology 2 domain-bearing protein tyrosine phosphatase substrate-1, TBS : TSP-binding site, TIM : T cell Ig and mucin domain-containing molecule (d'après Devitt & Marshall 2011).

A ceci s'ajoute la glycosylation des protéines de surfaces, les modifications de charge électrique ou encore l'expression d'Annexine A1 (Arur *et al.* 2003) comme signaux de reconnaissance. Mais le signal qui a concentré le plus d'attention est l'expression de la phosphatidylsérine (PtdSer) sur le feuillet externe de la membrane plasmique des cellules apoptotiques. La PtdSer est maintenue dans une cellule viable sur le feuillet interne de la membrane plasmique par un mécanisme ATP dépendant impliquant des translocases. Le mécanisme qui permet l'externalisation des PtdSer sur le feuillet externe est dépendant des caspases et fait intervenir un canal chlore, le TMEM16F, après activation calcique (Suzuki *et al.* 2010). Une mutation dans cette protéine a été reliée au syndrome de Scott pathologie

hémorragique qui se caractérise par un défaut de « scrambling » des PtdSer (Suzuki *et al.* 2010). Sur des thymocytes viables la présence de PtdSer sur le feuillet externe est estimé à moins de 0.9 pM/ 10^6 cellules, cette concentration devient supérieure à 240pM/ 10^6 cellules lors de l'apoptose ce qui permet d'estimer le nombre de PtdSer présentes sur un thymocyte apoptotique à 5-10 10^6 (Borisenko *et al.* 2003). La reconnaissance par un phagocyte d'une cellule apoptotique exprimant des PtdSer possède un seuil à environ 8 fois l'expression basale (Borisenko *et al.* 2003). Ces résultats amènent à se poser plusieurs questions : Quels sont les récepteurs impliqués dans cette reconnaissance ? Pourquoi y-a-t-il autant de récepteurs et quelle est la congruence entre leur présence sur le phagocyte et le nombre de PtdSer sur la cellule apoptotique ? Est-ce que l'expression de PtdSer est suffisante pour la reconnaissance des cellules apoptotiques ? Et enfin comment expliquer que les cellules exprimant des PtdSer en dehors d'un processus d'apoptose ne soient pas phagocytées ? De nombreux récepteurs ont été démontrés capables de lier directement les PtdSer : BAI1 (Brain-specific angiogenesis inhibitor 1) lie les PtdSer via sa séquence thrombospondine répétée (Park *et al.* 2007). Il est exprimé sur les macrophages mais surtout sur les cellules gliales. Le récepteur TIM-4 (T-cell Immunoglobulin and mucin-domain-containing molecule 4) est exprimé lui aussi sur les macrophages (Miyanishi *et al.* 2007). Mais il semble qu'il n'y ait pas de signalisation associé à TIM-4 (Park *et al.* 2009). La protéine Stabiline-2 est aussi capable de reconnaître les PtdSer (Park *et al.* 2008). De manière plus récente le récepteur RAGE a aussi été décrit comme capable de participer à la reconnaissance des PtdSer (He *et al.* 2011) ainsi que CD300f (Choi *et al.* 2011). Avec ces récepteurs plusieurs molécules d'adaptation formant un pont entre les PtdSer et un récepteur ont été décrites : il s'agit de MFG-E8 qui se lie aux PtdSer et à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Hanayama *et al.* 2004), et aussi de deux autres molécules Gas6 et la protéine S qui se lient aux PtdSer et sont reconnues par les récepteurs TAM (famille des récepteur Tyro-3-Axl-Mer) sur les macrophages (Scott *et al.* 2001). A ces différents récepteurs et molécules adaptatrices d'autres protéines ont été impliquées dans la reconnaissance des PtdSer, il s'agit de CD36, de la thrombospondine (Savill *et al.* 1991) ou encore de β_2 -GP1 glycoprotéine capable de faire le lien entre les PtdSer et son récepteur sur le macrophage (Balasubramanian *et al.* 1997).

Devant cette liste non exhaustive se pose la question de la raison de cette multiplicité des récepteurs impliqués. La réponse qui consiste à dire que ces récepteurs sont présents sur

certain types de phagocyte ne semble pas satisfaisante étant donné que la plupart sont présents sur les macrophages (Ravichandran 2010). Une autre question se pose alors : les molécules adaptatrices comme Gas6 (Balogh *et al.* 2005) ou la protéine S (Anderson *et al.* 2003) sont abondantes dans le plasma, comment peut-on alors avoir une liaison directe entre les PtdSer et TIM-4 par exemple ?

Une partie de la réponse à ces questions réside dans le fait que ces récepteurs et ces molécules adaptatrices 1) ont des affinités différentes vis-à-vis des PtdSer et 2) ne jouent pas le même rôle. En effet l'existence d'un seuil d'expression de la reconnaissance des cellules apoptotiques suggère la possibilité d'un processus séquentiel avec des récepteurs impliqués à différents temps de la reconnaissance (Borisenko *et al.* 2003). D'autre part l'état d'oxydation des PtdSer semble jouer un rôle dans la reconnaissance par certains récepteurs comme pour CD36 ou pour la liaison de MFG-E8 (Fadeel *et al.* 2007 ; Tyurin *et al.* 2008). Le modèle « Tethering and Tickle » (Henson & Hume 2006) illustre le fait que certains récepteurs pourraient avoir une fonction d'accrochage de la cellule apoptotique sans nécessairement induire de signalisation (comme TIM-4 par exemple) et d'autres être impliqués dans la signalisation qui va enclencher la phagocytose (comme MER ou BAI1). Si ces récepteurs ont des fonctions différentes se pose toutefois la question de la disponibilité des PtdSer pour chacun d'eux, problème que nous nommerons de congruence. Essayons d'illustrer ce problème de manière quantitative. L'expression de PtdSer à la surface augmente d'un facteur ~ 280 au cours de l'apoptose de manière rapide $\sim 1h$ (Ravichandran 2010). En ordre de grandeur rapporté à une cellule cela représente $5-10 \cdot 10^6$ molécules de PtdSer par cellule. Le nombre de molécules réceptrices à la surface par cellule phagocytaire n'est pas connu mais une estimation raisonnable de $\sim 10^5$ est probablement dans le bon ordre de grandeur (Zagursky *et al.* 1995). On peut donc évaluer le nombre de molécules de PtdSer disponibles pour un récepteur :

$$\frac{N_{PS}}{N_{Recepteurs}} \approx \frac{10 \cdot 10^6}{10^5} \frac{S_{M\phi}}{S_{Apo}} = 100 \frac{S_{M\phi}}{S_{Apo}} \sim 100 \left(\frac{R_{M\phi}}{R_{Apo}} \right)^2 \sim 10^3$$

Où S et R représente la surface totale et la taille caractéristique d'une cellule, nous avons considéré comme ordre de grandeur qu'un macrophage possède une surface 10 fois supérieure à celle de la cellule apoptotique. Il a de plus été montré que l'annexin V, protéine

qui se lie aux PS, couvre une surface ~50 molécules de PtdSer (Cézanne *et al.* 1999), d'où le résultat que la densité de PtdSer autorise l'existence de 20 récepteurs différents pour 1000 molécules de PtdSer ce qui écarte un problème de gêne stérique à la surface du phagocyte. Ce calcul uniquement basé sur les ordres de grandeur suppose que la répartition des PtdSer comme des récepteurs est uniforme, or il est possible que les PtdSer forment des clusters à la surface des cellules apoptotiques (Gardai *et al.* 2005) ce qui augmente encore le nombre de PtdSer disponibles pour lier leurs récepteurs dans la zone de contact. Est-ce que la présence de PtdSer à la surface d'une cellule apoptotique suffit pour engager la phagocytose ? Le blocage par l'annexin V de la reconnaissance des PtdSer inhibe bien la phagocytose (Fadok *et al.* 1998a). Mais l'expression de PS sur des cellules non apoptotiques (macrophages, lymphocytes ou plaquettes activés) non suivie de phagocytose impose de faire intervenir d'autres molécules. Ces molécules sont décrites comme des signaux inhibiteurs de « don't eat me ». Plusieurs protéines ont été décrites comme jouant ce rôle. CD47 (aussi appelée integrin-associated protein) est une protéine de surface reconnue par le récepteur SIRP α qui inhibe la phagocytose d'une cellule même en présence de PtdSer (Tsai & Disher 2008). CD31 joue le même rôle (Brown *et al.* 2002). Un travail récent suggère que la répartition des phospholipides sur le feuillet externe pourrait jouer un rôle modulateur, en effet le récepteur CD300a reconnaît les phosphatidylserines et phosphatidylethanolamines (PE) sur la surface des cellules apoptotiques et inhibe leur phagocytose (Simhadri *et al.* 2012). L'expression de PE pourrait alors être interprétée comme un signal « don't eat me yet » à la surface des cellules apoptotiques.

1.3 Phase 3 Phagocytose

Le mécanisme qui permet une fois la cellule apoptotique arrimée au macrophage d'être phagocyté a été en grande partie décortiqué grâce à des études génétiques chez *Caenorhabditis elegans*. Nous allons résumer le mécanisme qui amène au remaniement du cytosquelette chez les vertébrés et nous indiquons la correspondance chez *Caenorhabditis elegans* et chez l'homme dans le tableau II.1.

Tableau II.1 : Protéines de signalisation impliquées dans la phagocytose des cellules apoptotiques (adapté de Hochreiter-Hufford & Ravichandran 2013)

C. Elegans	Mammifère	Fonctions
CED-1	LRP1(CD91)	Récepteur de surface reconnaissant la calréticuline à la surface de la cellule apoptotique
CED-2	CrklI	Protéine adaptatrice qui se lie à Dock180 et ELMO
CED-5	Dock180	Facteur d'échange de guanine qui charge Rac de GTP
CED-6	GULP	Molécule adaptatrice qui se lie à la stabiline-2
CED-7	ABCA1/ABCA7	Transporteur ABC impliqué dans l'efflux de cholestérol
CED-10	Rac	Rho GTPase régulant l'activité de Arp2/ 3, la polymérisation de l'actine
CED-12	ELMO	Protéine adaptatrice qui accroit la fonction facteur d'échange de Dock180

La signalisation permettant la phagocytose aboutit à l'activation d'une Rho GTPase Rac1. Deux voies d'activation de Rac1 sont connues (Green 2011), l'une sous la dépendance des récepteurs stabiline-2 ou LRP et l'autre sous la dépendance de BAI1 (Figure II.3).

1.4 Etape 4 Maturation du phagosome : « clear me »

Une fois la cellule apoptotique internalisée dans le phagocyte la dégradation commence et la gestion des déchets s'impose. La fusion entre un phagosome et des lysosomes permet l'apport des enzymes de dégradation. Le phagocyte se retrouve confronté à la gestion d'un apport de nucléotides, de lipides, de cholestérol et de peptides dont la quantité double approximativement (Han & Ravichandran 2011). Cette gestion est fondamentale car un macrophage peut avoir à phagocyter un grand nombre de cellules apoptotiques et doit donc maintenir son homéostasie cellulaire. L'ADN est dégradé par l'enzyme lysosomale DNase II (Kawane *et al.* 2006) et le cholestérol est exporté par ABCA1 (ATP-binding cassette transporter 1) qui est synthétisé en réponse à l'activation de PPAR- γ (peroxisome-proliferator-activated receptor- γ) permettant son efflux hors de la cellule (Kiss *et al.* 2006).

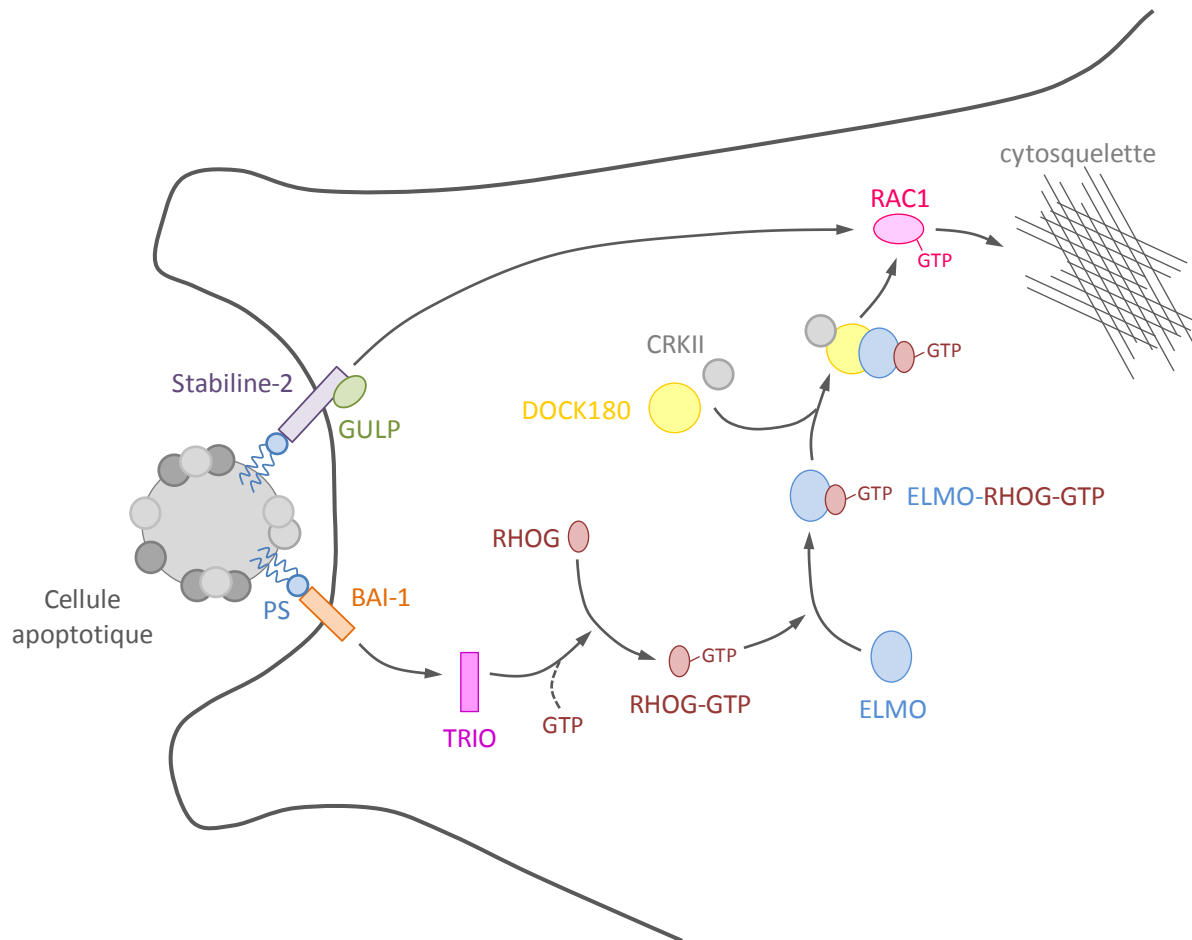


Figure II.3 : Différentes étapes de signalisation qui permettent le réarrangement du cytosquelette nécessaire à la phagocytose de la cellule apoptotique. La voie d'activation de RAC1 dépend de l'activité du complexe ELMO-DOCK180. Lorsqu'un récepteur comme BAI-1 est activé une protéine de la famille de GEF (Guanine nucleotide exchange factor) la protéine TRIO charge une molécule de GTP sur la GTPase RHOG qui à son tour va recruter ELMO (engulfment and cell motility 1). ELMO va alors se lier au domaine SH3 d'une autre protéine GEF : DOCK180 qui associées à CRKII (CT 10 regulator of kinase II) vont activer RAC1. Dont la fonction est la réorganisation du cytosquelette (adapté de Green 2011 et Ravichandran & Lorenz 2007).

Une étude récente a montré que l'augmentation du potentiel de membrane mitochondrial (ψ_m) au cours de la phagocytose d'une cellule apoptotique n'était pas accompagnée de synthèse d'ATP, ce mécanisme de contrôle est sous la dépendance de Ucp2 (uncoupling proteins 2) qui découple la synthèse d'ATP du potentiel de membrane (Park *et al.* 2011). Ce contrôle de la production d'ATP était fondamental pour la capacité du macrophage à poursuivre la phagocytose d'autres cellules apoptotiques. Ce contrôle des déchets est rendu

particulièrement nécessaire par le fait que la phagocytose d'une cellule apoptotique favorise la poursuite de la phagocytose d'autres cellules apoptotiques via l'activation de LXR (liver-X receptor) qui induit l'expression de MER récepteur de Gas6 (A-Gonzalez *et al.* 2009).

2. Reprogrammation du macrophage durant l'efferocytose

2.1. Les macrophages un groupe cellulaire hétérogène

La reconnaissance historique des macrophages comme cellules phagocytaires spécialisées a été apportée par Elie Metchnikoff au début du XXème siècle. Le nombre de type de macrophages tissulaires identifiés principalement par l'expression de marqueurs de surface n'a cessé de grandir depuis. Les noms attribués à ces macrophages sont le plus souvent rattachés à leur localisation (par ex. macrophages de la zone marginale) ou parfois au nom de leur découvreur (par ex. cellules de Kupffer pour les macrophages hépatiques). Cette dénomination est peu informative sur l'origine ou la fonction de ces cellules. Chez la souris un réel effort de clarification de ces différents types cellulaires a été effectué et il est marquant de noter la très grande hétérogénéité de ces cellules (Tableau II.2 et II.3).

Tableau II.2 : Hétérogénéité des macrophages dans les tissus lymphoïdes (d'après Hashimoto *et al.* 2011).

Rate	Ganglions lymphatiques	Moelle osseuse	Thymus
<i>Pulpe rouge</i> F4/80 ^{hi} CD11b ^{lo} CD169 ^{lo} CMHII ^{lo} CD163 ⁺ CD68 ⁺ CD115 ⁺ CD172a ⁺	<i>Sinus sous-capsulaire</i> F4/80 ^{lo} CD11b ⁺ CD169 ⁺ CD11c ^{lo} MARCO ⁺	<i>Niche hématopoïétique</i> F4/80 ⁺ CD11c ^{lo} CD169 ⁺ CD11c ^{lo} CD68 ⁺ CX3CR1 ⁻ CD115 ⁺	<i>Sous capsulaire</i> CMHII ⁺ F4/80 ⁺ Mac-2 ⁻ FcγRII ⁺ FcγRIII ⁺
<i>Zone marginale</i> F4/80 ⁻ SIGNR1 ⁺ MARCO ⁺	<i>Zone médullaire</i> F4/80 ^{hi} CD11b ⁺ CD169 ⁺ CD11c ^{lo}		<i>Cortical</i> CMHII ⁺ F4/80 ⁺ Mac-2 ⁺ FcγRII ⁺ FcγRIII ⁺
<i>Centre germinatif</i> F4/80 ⁻ CD169 ⁺	<i>Centre germinatif</i> CMHII ⁺ F4/80 ⁺ CD169 ⁺ CD11c ^{hi} CD8 ⁺		<i>Cortico-médullaire</i> CMHII ⁺ F4/80 ⁺ Mac-2 ⁺ FcγRII ^{hi} FcγRIII ^{hi}
<i>Centre germinatif</i> F4/80 ⁻ CD11b ⁻ CD68 ⁺ MFG-E8 ⁺	Mφ CD11c ^{hi} CD169 ⁺		<i>Médullaire</i> CMHII ^{hi} F4/80 ⁺ Mac-2 ⁺ FcγRII ⁺ FcγRIII ⁺

Tableau II.3 : Hétérogénéité des macrophages dans les tissus non-lymphoïdes et MALT (d'après Hashimoto et al. 2011).

Foie	Poumon	Tube digestif	Peau	Rein
<i>Cellules de Kupffer</i> F4/80 ^{hi} CD11b ^{lo} CD169 ⁺ CD68 ⁺ Mac-2 ⁺	<i>Mφ Alvéolaires</i> F4/80 ^{hi} CD11b ^{lo} CD169 ⁺ CD11c ^{hi} CD68 ⁺ Mac2 ⁺ SiglecF ⁺ MARCO ⁻	<i>Mφ lamina propria</i> CMHII ⁺ F4/80 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺ CD103 ⁻ CD115 ⁺ CX3CR1 ⁺ D172a ⁺	<i>Mφ dermiques</i> F4/80 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ^{lo} CD206 ⁺ mMGL ⁺ CMHII ^{lo}	F4/80 ^{hi} CD11b ^{lo} CD169 ⁺ CD68 ⁺ Mac-2 ⁺
	<i>Mφ interstitiaux</i> F4/80 ⁺ CD11c ⁻ CD68 ⁺ CMHII ⁺	<i>Mφ séreux</i> CMHII ^{hi} F4/80 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ^{lo} CD103 ⁻ CD169 ⁺ CX3CR1 ⁺ D115 ⁺		

MALT :mucosa-associated lymphoid tissue

Cette hétérogénéité phénotypique est associée à une spécialisation fonctionnelle. L'exemple le plus frappant est celui des ostéoclastes : population de macrophages spécialisée dans la résorption osseuse (Edwards & Mundy 2011). Les macrophages de la moelle osseuse quant à eux sont impliqués dans la rétention des cellules souches hématopoïétiques (Chow *et al.* 2011). Dans les ganglions lymphatiques les macrophages sous capsulaires sont une ligne de défense efficace contre l'invasion virale (Iannacone *et al.* 2010). Cette spécialisation a été confirmée par le fait qu'en plus du facteur de transcription PU.1 et de Csf-1R (récepteur du M-CSF) contrôlant le programme « macrophage », les facteurs de transcription c-fos et MITF contrôle la différenciation en ostéoclastes et Spi-C celle en macrophage de la pulpe rouge de manière spécifique (Kohyama *et al.* 2009). Si ces spécialisations sont fondamentales il n'en reste pas moins que les macrophages ont tous une capacité importante de phagocytose des pathogènes mais aussi des cellules apoptotiques, ainsi qu'une implication majeure dans la surveillance anti-tumorale (Jaiswal *et al.* 2010).

2.2. Origine des macrophages

La vision la plus commune du développement des macrophages attribue aux monocytes circulants le rôle majeur de cellules dont ils dérivent. Les preuves directes expérimentales démontrant cette filiation sont moins définitives que le laisse supposer le dogme classique. En effet on distingue traditionnellement deux types de macrophages : les macrophages tissulaires et les macrophages infiltrants. Les macrophages infiltrant dérivent directement

des monocytes dits « classiques » (ou inflammatoires chez la souris Ly6C^{hi}). Ce lignage a été démontré dans différentes situations pathologiques comme l'athérosclérose, les maladies dites « métaboliques » (Ingersoll *et al.* 2011) et le cancer (Qian *et al.* 2011). La contribution des monocytes circulants à la présence de macrophages tissulaires résidents est controversée. Des données anciennes basées sur des techniques radio-isotopiques avaient suggéré que des cellules issues de la moelle participaient à la reconstitution du compartiment macrophagique tissulaire post irradiation (van Furth *et al.* 1968). Ces données ont été confirmées par radio marquage de monocytes dans une expérience de parabiose¹ en ce qui concerne les macrophages péritonéaux (Parwaresch *et al.* 1984). Dans un modèle de transfert adoptif il a été montré que les monocytes Gr1^{lo} contribuaient au renouvellement des macrophages pulmonaires après déplétion des cellules CD11c⁺ dans une souris transgénique CD11c-DTR (Landsman *et al.* 2007). Si ces résultats sont suggestifs il n'en reste pas moins que la présence de macrophages dans le sac vitellin (le Yolk-sac des anglo-saxons) murin à 8 jours de développement embryonnaire (identifiés par marquage F4/80) avant l'apparition des monocytes appelle une explication (Takahashi *et al.* 1989). Il a été possible de démontrer que les macrophages résidents du système nerveux central étaient issus des macrophages du sac vitellin et que le maintien de cette population ne nécessitait pas les monocytes (Ginhoux *et al.* 2010). Ce travail a été complété récemment par une étude portant sur les macrophages pulmonaires en utilisant une déplétion non génotoxique (sur des souris CD169-DTR). Ce système a permis de montrer que la déplétion était suivie d'une prolifération locale sans dépendance d'un recrutement de monocytes (les souris CD169DTR^{+/-}Ccr2^{+/-} et CD169DTR^{+/-}Ccr2^{-/-} se comportaient de manière identiques). Mais cette prolifération était dépendante des cytokines M-CSF et GM-CSF mais pas de l'IL-4 (Hashimoto *et al.* 2013). Il a aussi été possible de montrer que les macrophages résidents étaient capables de reformer une population après ablation cellulaire par une infection virale (virus influenza PR8) ou du Poly(I :C). Ces résultats complètent une étude antérieure qui avait rapporté une prolifération locale de macrophages pleuraux (avec un état d'activation de type M2) au cours d'une infection parasitaire (*Litomosoides sigmodontis*) dans un mécanisme IL-4 dépendant (Jenkins *et al.* 2011). De manière complémentaire le développement des macrophages du sac vitellin a été montré indépendant du facteur de

¹ La parabiose est une technique expérimentale qui consiste à greffer les deux systèmes vasculaires de deux animaux différents ensembles.

transcription Myb qui est fondamental pour le développement des cellules souches hématopoïétiques et des monocytes CD11b^{hi} et que cela concernait aussi les macrophages résidents du foie (Cellules de Kupffer) et la microglie (Schulz *et al.* 2012). Il semble donc qu'il y ait une origine distincte pour les macrophages résidents et les macrophages infiltrants. Cette donnée doit nous permettre de mieux préciser le rôle respectif des macrophages résidents et des macrophages issus de la moelle osseuse dans l'homéostasie tissulaire (figure II.4).

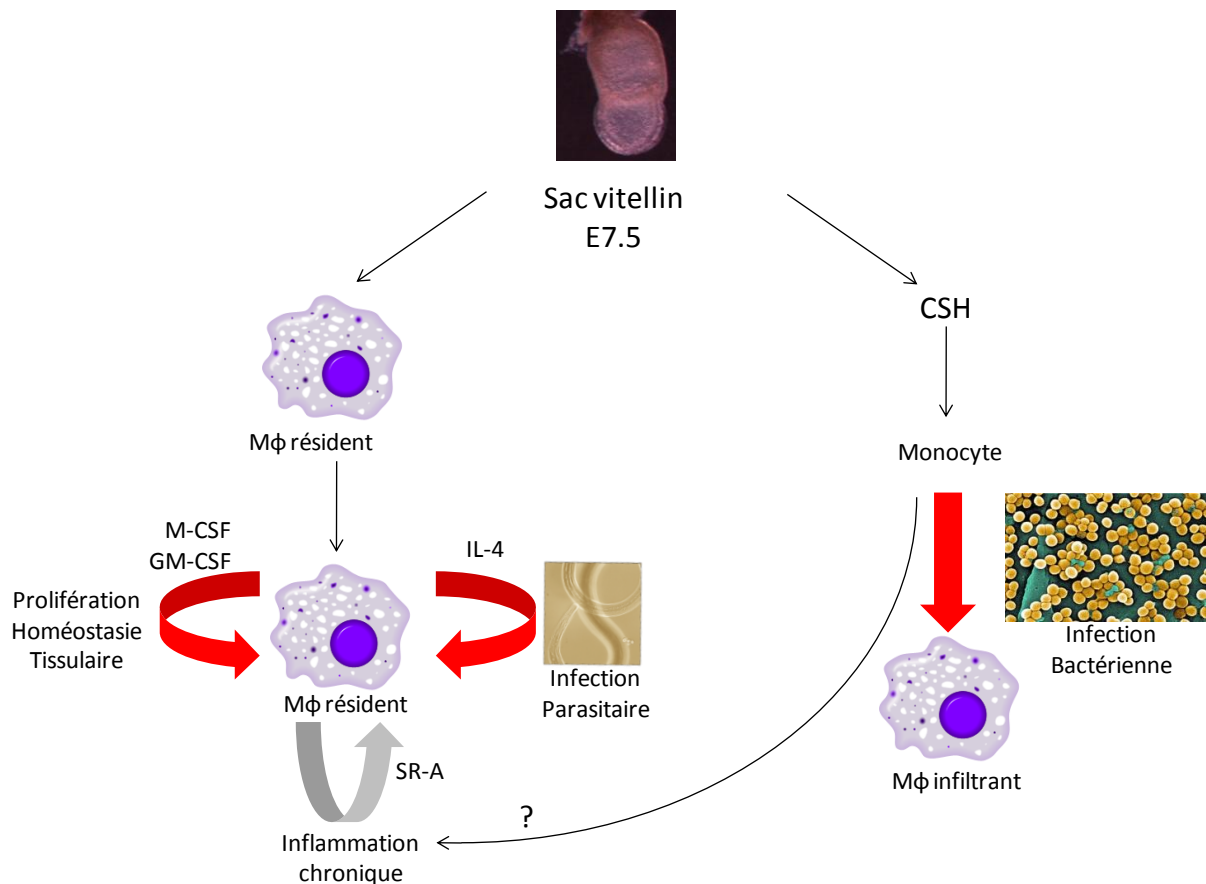


Figure II.4 : Les populations de macrophages résidents et infiltrant sont d'origines distinctes. Les macrophages infiltrant sont issus des monocytes circulant recrutés dans un contexte inflammatoire aigu comme une infection bactérienne. Les macrophages résidents sont quant à eux originaires directement du sac vitellin. La possibilité, reconnue récemment, de prolifération des macrophages résidents dans des contextes d'homéostasie tissulaire ou lors d'un processus inflammatoire ouvre de nouvelles voies thérapeutiques dans le contrôle de ce type cellulaire. SR-A :scavenger receptor A.

De manière très intéressante mais provocante une étude récente, reposant sur des expériences de parabiose, vient de proposer que les macrophages intra-plaque

athéromateuse proliféraient. Dans ce travail les auteurs suggèrent que les monocytes circulants peuvent avoir un rôle initial d'ensemencement mais que la prolifération des macrophages par un mécanisme dépendant du SR-A (Scavenger Receptor) représente la composante principale de l'infiltration macrophagique (Robbins *et al.* 2013). Ce travail nécessitant confirmation pourrait bouleverser notre appréhension des populations macrophagiques sur un site inflammatoire chronique avec une reconnaissance négligée jusqu'ici de la prolifération des macrophages comme mécanisme d'expansion de ce type cellulaire.

2.3. Polarisation du macrophage

Si l'origine des macrophages présente une certaine hétérogénéité, l'état d'activation d'un macrophage représente quand à lui une hétérogénéité encore plus grande. S'inspirant de la classification Th1/Th2 des lymphocytes CD4⁺, les macrophages ont été classés en macrophage M1 (état d'activation classique) et M2 (activation alternative). Cette classification s'est récemment complexifiée avec la description avec de macrophages de type M2a, M2b et M2c. Il est toutefois admis que ces classifications, si parfois elles sont utiles, ne recouvrent pas le caractère continu des différents états des macrophages *in vivo* (Mosser *et al.* 2008 ; Sica & Mantovani 2012). Ces limites étant posées les macrophages M1 se caractérisent par l'expression de cytokines pro-inflammatoires, de production d'espèces réactives de l'oxygène, de promotion de la réponse Th1 et d'une activité anti-tumorale et antibactérienne. Les macrophages de type M2 sont eux impliqués dans la réponse antiparasitaire, favorisent la réparation tissulaire, ont des fonctions immuno-modulatrices et en contrepartie sont impliqués dans la croissance tumorale. Ces macrophages (M2) ont une grande capacité de phagocytose notamment vis-à-vis des cellules apoptotiques. La reconnaissance du continuum entre ces deux formes extrêmes de polarisation s'accompagne de la possibilité de transition d'un état à l'autre (Figure II.5).

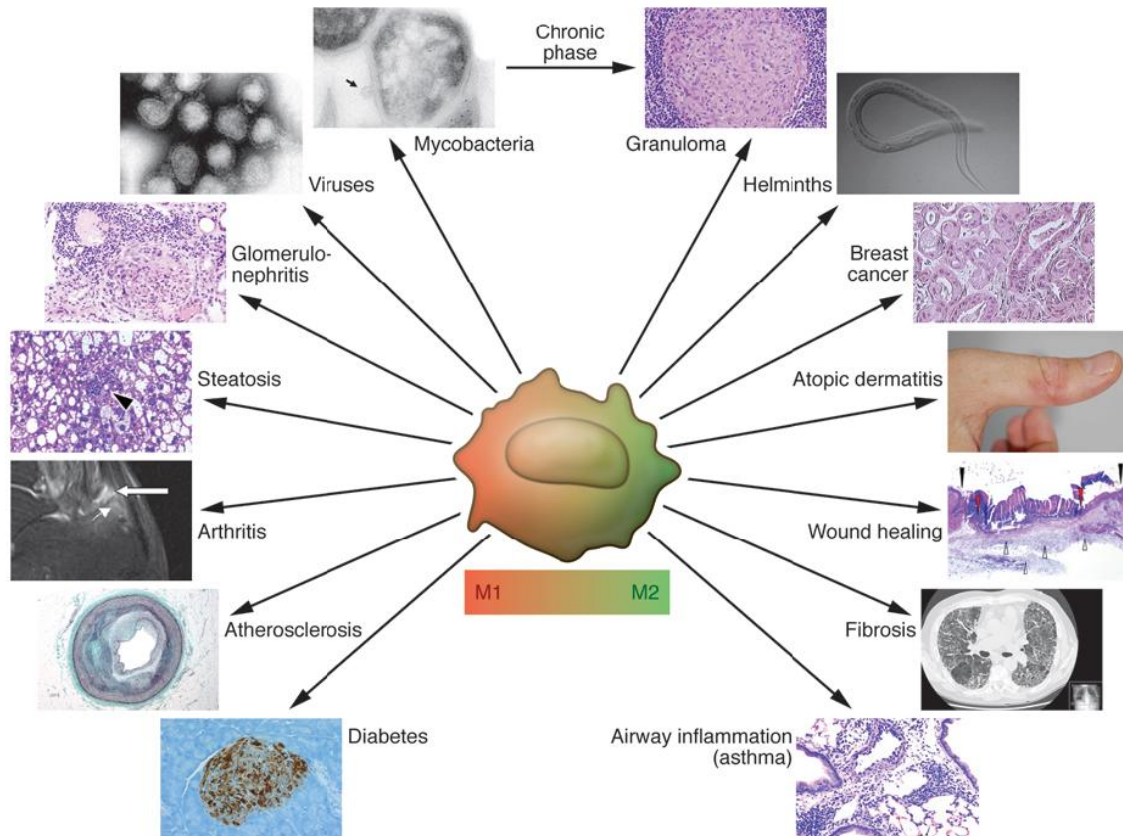
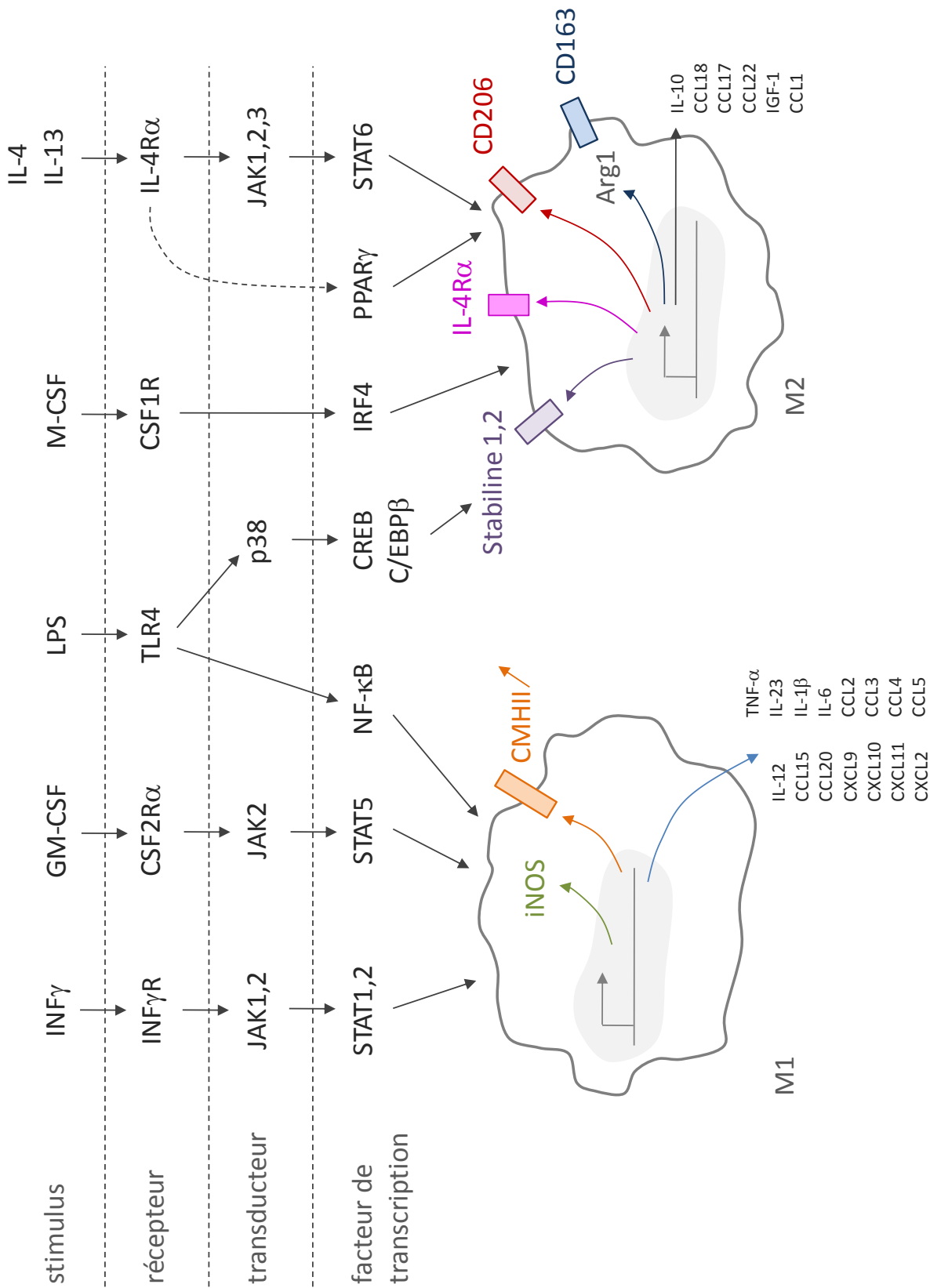


Figure II.5 : Description des états d'activation des macrophages en état M1 (activation classique) et M2 (activation alternative). Ces deux états sont des extrêmes d'un phénotype macrophagique qui peut se trouver dans un état intermédiaire. La possibilité de passage d'un phénotype à un autre est aussi représentée (d'après Sica & Mantovani 2012).

L'état de polarisation du macrophage résulte de la transduction d'un signal qui va provoquer l'engagement d'un programme transcriptionnel spécifique (Figure II.6).

Figure II.6 (page ci-contre) : La polarisation M1 ou M2 du macrophage dépend de la transduction de signaux qui initie un programme transcriptionnel pré-déterminé. Nous avons représenté les principales voies de signalisation impliquées. Arg1 : arginase 1 C/EBP β : CCAAT/enhancer-binding protein- β , CREB : cAMP-responsive element-binding protein, iNOS: inducible nitrite oxide synthase, STAT : signal transducer and activator of transcription (adapté de Lawrence & Natoli 2011 et Sica & Mantovani 2012).



2.4. Changement de programme durant l'efferocytose

Au cours de l'efferocytose le macrophage modifie son programme transcriptionnel vers un phénotype anti-inflammatoire qui est illustré par l'inhibition de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires en réponse à un stimulus comme le LPS (Voll *et al.* 1997, Fadok *et al.* 1998). Cette phagocytose s'associe à la sécrétion de TGF- β (Huynh *et al.* 2002) et de VEGF (Golpon *et al.* 2004). Dans un travail utilisant des cellules T Jurkat apoptotiques phagocytées par des macrophages péritonéaux de souris mobilisés par le thioglycollate, cette sécrétion était associée à une inhibition de l'expression d'iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) et une augmentation de l'expression d'arginase-1 (Freire-de-lima *et al.* 2006). Cette modification du phénotype macrophagique fait intervenir les facteurs de transcription PPAR- γ (Freire-de-lima *et al.* 2006), PPAR- δ (Mukundan *et al.* 2009) et LXR (A-Gonzales *et al.* 2009). Ces résultats posent la question du lien entre le phénotype M2 et le phénotype des macrophages ayant phagocyté des cellules apoptotiques. Initialement, la découverte du contrôle de l'expression de PPAR- γ et PPAR- δ par l'IL-4 et l'IL-13 impliquées dans l'orientation M2 (Huang *et al.* 1999 ; Kang *et al.* 2008) ainsi que la synergie entre LXR et IL-4 pour induire l'expression d'arginase-1 (Pourcet *et al.* 2011) semblait indiquer une proximité très grande entre activation de type M2 et phénotype résolutif au cours de l'efferocytose. Cette impression était renforcée par l'induction connue de la 12/15-lipooxygénase (12/15-LO) par les cytokines IL-4 et IL-13 mais aussi par la clairance des cellules apoptotiques (Uderhardt *et al.* 2012). Cette enzyme est fondamentale dans la production de lipides impliqués dans la phase de résolution de l'inflammation comme la lipoxine A4, la protectine D1, la résolvine D1 et la marésine (Serhan 2010). Mais l'étude des macrophages de phénotype résolutif s'est révélée plus compliquée que l'image simpliste d'une adéquation avec le phénotype M2 ; en effet les macrophages présentant un phénotype résolutif au cours d'une péritonite induite par zymosan étaient aussi associés à l'expression de iNOS et COX2 qui sont deux marqueurs de type M1 (Bystrom *et al.* 2008). L'analyse transcriptomique de ces macrophages a conclu qu'il était impossible de les faire rentrer dans une classification de type M1/M2 (Stables *et al.* 2011). De manière complémentaire une autre étude utilisant un modèle de péritonite au zymosan a montré que les macrophages présents sur le site inflammatoire identifiés comme CD11b^{hi} exprimant iNOS, COX2 mais aussi l'arginase 1 mais pas de 12/15 LO. Après la phagocytose d'un nombre suffisant de neutrophiles apoptotiques ces macrophages atteignent un état de « satiété »

qui s'accompagne d'une migration vers les ganglions lymphatiques² et d'une diminution des capacités de captation de nouvelles cellules apoptotiques. Ces macrophages pro-résolutifs sécrètent de grande quantité de TGF- β et se présentent avec un profil CD11b^{lo}. Ils expriment de plus la 12/15 LO et ont une expression très faible d'iNOS, COX2 mais aussi de l'arginase 1 (Schif-Zuck *et al.* 2011). De manière intéressante le seuil de satiété était modifiable par la résolvine E1 et la dexaméthasone permettant une transition plus précoce vers le phénotype CD11b^{lo} (Schif-Zuck *et al.* 2011). Cet effet illustre le fait que la fonction de clairance des macrophages n'est pas intrinsèque à ceux-ci mais sous la dépendance de leur environnement. En effet, dans un environnement inflammatoire (LPS) les macrophages diminuent leur expression de CD36 et CD14 (Krausgruber *et al.* 2011), de PPAR- γ (Welch *et al.* 2003) mais aussi de Gas6 (Feng *et al.* 2011) et MGF-E8 (Komura *et al.* 2009). Le TNF- α a aussi la capacité de diminuer de manière dose dépendante la capacité des macrophages à phagocyter des cellules apoptotiques (Michlewska *et al.* 2009). De manière notable ce n'est pas le cas de l'INF- γ (Fernandez-Boyanapalli *et al.* 2010). D'autres molécules peuvent moduler les capacités de phagocytose des macrophages, nous les avons déjà rencontré, il s'agit de HMGB1 (Banerjee *et al.* 2010) et de l'annexine V (Kenis *et al.* 2006) qui sont susceptibles de masquer les PtdSer. A contrario l'oxydation des PtdSer (lysophosphatidylserine) par un mécanisme dépendant de la NADPH oxydase joue un rôle facilitateur dans la captation des cellules apoptotiques (Frasch *et al.* 2011, Frasch *et al.* 2013). Ces études pointent du doigt la complexité et l'hétérogénéité des populations macrophagiques impliquées dans la phase de résolution. Il est de plus nécessaire de noter que le changement de phénotype vers un phénotype pro-résolutif peut se faire par modification du programme du macrophage comme défendu dans les deux précédentes études mais aussi par expansion de populations de macrophages de type M2 comme cela a été démontré dans le cas d'une infection parasitaire (Jenkins *et al.* 2011). Si ces résultats sont importants il faut toutefois rappeler que la plus part des travaux sont effectués chez la souris et que les travaux *in vitro* sur des macrophages différenciés humains par M-CSF ne sont pas nécessairement proche de la

² La migration des macrophages après phagocytose de cellules apoptotiques vers les ganglions lymphatiques est un sujet controversé. En effet une étude récente a mis en évidence que la migration est en fait minoritaire (dépendant de CCR7) et que le principal mécanisme de régulation de la population macrophagique sur le site inflammatoire est l'apoptose des macrophages. En effet l'inhibition de la migration (souris CCR7^{-/-}) ne modifie que peu la cinétique de la population de macrophage et les souris Bim^{-/-} ou transgéniques CD68-Bcl2 maintenaient leur population de macrophages plus longtemps sur le site inflammatoire (Gautier *et al.* 2013).

physiologie où par exemple le rôle endogène de l'IL-4 dans les capacités de phagocytose est fondamental (Fernandez-Boyanapalli *et al.* 2009).

3. Effet immunomodulateur de la clairance des cellules apoptotiques

Nous avons présenté jusqu'à maintenant le phénomène de clairance d'une cellule apoptotique comme un phénomène anti-inflammatoire notamment par l'induction de TGF- β par les macrophages (Fadok *et al.* 1998) ou d'IL-10 par les monocytes (Byrne & Reen 2002). Mais la survenue d'une mort cellulaire peut faire intervenir d'autres phagocytes en premier lieu desquels les cellules dendritiques, cellules professionnelles de la présentation antigénique ou encore impliquer d'autres mort que l'apoptose. Tenant compte du type de cellule morte, du type de mort, du lieu de la mort, du type de cellule phagocytant la cellule morte, du type d'antigène présenté, du contexte extracellulaire on est forcé de reconnaître la complexité du phénomène et l'impossibilité d'énoncer des règles générales sur l'aspect tolérogène ou immunogène d'un certain type de mort cellulaire (Green *et al.* 2009). L'idée simple que la sécrétion de DAMP par les cellules nécrotiques serait immunogène alors que la clairance des cellules apoptotiques serait tolérogène ne tient pas (Green *et al.* 2009). En effet dans un contexte tumoral l'apoptose associée à une chimiothérapie ou une radiothérapie s'associe avec l'expression de calréticuline à la surface de la cellule apoptotique, qui sécrètent d'autres protéines chaperons comme HSP70 ou HSP90 associées à HMGB1 ce qui va mener à la maturation des cellules dendritiques et conduire à une réponse Th1 et T cytotoxique (Obeid *et al.* 2007a, Obeid *et al.* 2007b). Dans le cas tolérogène la phagocytose d'une cellule apoptotique s'associera à la sécrétion de TGF- β par les macrophages (Fadok *et al.* 1998) ou les cellules dendritiques immatures (Perruche *et al.* 2008). Ce profil s'associe à une diminution de la sécrétion d'IL-12 par les phagocytes (Kim *et al.* 2004) ainsi que l'inhibition de la granulopoïèse par inhibition de la sécrétion d'IL-23 et d'IL-17 (Stark *et al.* 2005). Si le rôle des macrophages dans la production d'un environnement tolérogène est bien démontré (notamment dans le foie et la rate) (Miyake *et al.* 2007), les cellules dendritiques sont elles aussi en première ligne. Au même titre que les macrophages, des cellules dendritiques dérivées de la moelle de souris sont capables de phagocyter des cellules apoptotiques ce qui induit une inhibition de la réponse au LPS en terme de maturation (expression de CD86) ou de sécrétion d'IL-12 (Stuart *et al.* 2002). La prise en charge des cellules apoptotiques par les cellules dendritiques *in vivo* relève de sous

populations, comme par exemple chez le rat au niveau de l'intestin (population CD4⁺), qui phagocytent les cellules apoptotiques et migrent vers les ganglions lymphatiques pour présenter les antigènes de ces cellules dans un contexte tolérogène (Huang *et al.* 2000). Dans la zone marginale de la rate cette fonction est dévolue aux cellules dendritiques CD8⁺α (Morelli *et al.* 2003). Si les cellules dendritiques conventionnelles sont sensibles dans leur maturation aux cellules apoptotiques, leurs capacités de migration sont intactes et notamment l'expression de CCR7 leur permettant de répondre à un gradient de CCL19 et/ou CCL21. Ce qui les autorise à continuer de délivrer un signal tolérogène au T naïfs (Verbovetski *et al.* 2002). Une des conséquences de ces signaux tolérogènes est la production de lymphocytes T régulateurs (Foxp3⁺) ou de Tr1 (IL-10⁺). Cette production de cellules régulatrices fait intervenir une sous classe de cellules dendritiques : les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Ces cellules ont été impliquées dans la génération de Tr1 (Wakkach *et al.* 2003), mais aussi de T régulateurs dans un contexte de clairance des cellules apoptotiques (Bonnefoy *et al.* 2011). Ces cellules sont capables de phagocyter les cellules apoptotiques et de présenter les antigènes périphériques résultant dans le thymus (Hadeiba *et al.* 2012) où elle participe à la production de T régulateurs (Hanabuchi *et al.* 2010).

La phagocytose d'une cellule secondairement nécrotique est quand à elle influencée par l'annexine V qui inhibe sa captation par les macrophages mais non par les cellules dendritiques induisant alors une réponse pro-inflammatoire. Ce fait est illustré par les macrophages d'une souris AnxV^{-/-} qui sécrètent de l'IL-10 après phagocytose de ces cellules secondairement nécrotiques (Frey *et al.* 2009). Un autre mode de contrôle de la réponse aux cellules apoptotiques est joué par la 12/15-LO qui exprimée par les macrophages résidents permet l'oxydation des phosphatidylethanolamine à la surface du macrophage captant ainsi la molécule d'adaptation MGF-E8 ce qui permet la clairance des cellules apoptotiques avec production d'un environnement anti-inflammatoire. Dans les souris 12/15-LO^{-/-} les macrophages ne sont plus la source de phagocytose mais ce sont les monocytes Ly6C^{hi} qui vont présenter les antigènes du soi issus des cellules apoptotiques et induire alors une glomérulonéphrite auto-immune (Uderhardt *et al.* 2012). De manière très intéressante plusieurs études se sont focalisées sur le comportement des macrophages vis-à-vis de signaux mimant une cellule apoptotique comme des liposomes composés de phosphatidylsérine qui induisent la production de TGF-β (Huynh *et al.* 2002). Ces travaux ont

aussi permis de montrer que la phagocytose n'était pas nécessaire pour inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 mais qu'un simple contact cellulaire sans phagocytose (inhibée par la cytochalasine D) pouvait suffire (Kim *et al.* 2004).

PARTIE III : Contexte du travail

Ce travail de thèse s'inscrit dans la thématique du laboratoire portant sur la physiopathologie de la granulomatose avec polyangéite qui était dénommée précédemment maladie de Wegener. Nous allons donc présenter cette pathologie d'un point de vue physiopathologique. Nous allons préciser le caractère unique de cette pathologie au sein du groupe des vascularites à ANCA (Anti Neutrophil Cytoplasmic antibodies). Ce caractère unique nous amènera à nous intéresser de près à la protéinase 3, sérine protéase du neutrophile cible des ANCA dans la granulomatose avec polyangéite.

1. Article 1 : La physiopathologie des vascularites à ANCA

Les vascularites à ANCA regroupent trois entités distinctes : la granulomatose avec polyangéite, la polyangéite microscopique et la granulomatose avec polyangéite et éosinophilie (anciennement syndrome de Churg et Strauss). Ces trois pathologies ont comme point commun d'être des vascularites impliquant des vaisseaux de petit calibre et d'être associées à une auto-immunité dirigée contre des éléments du cytoplasme des neutrophiles. Dans l'article de revue qui suit nous avons résumé les éléments clés qui interviennent dans la physiopathologie de ces maladies. Les particularités de la granulomatose avec polyangéite au sein du groupe des vascularites à ANCA seront approfondies dans le second article de cette partie.

ARTICLE 1

2. Article 2 : Les vascularites à ANCA ; est-il temps de séparer le groupe ?

Comme nous l'avons suggéré en conclusion de l'article précédent l'existence de granulome et d'une auto-immunité spécifique dirigée contre la protéinase 3, les mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans la granulomatose avec polyangéite (GPA) sont probablement propres à cette pathologie. De multiples travaux portant sur la physiopathologie des vascularites à ANCA ont démontré l'implication des ANCA et leur rôle éventuellement pathogène. Dans ces travaux la distinction entre GPA et MPA n'était pas clairement énoncée et les schémas physiopathologiques proposés insistaient principalement sur les mécanismes communs à ces pathologies. Or il existe des réelles différences entre ces deux pathologies, ce que nous avons entrepris de décrire dans l'article suivant. La conclusion principale de cet article peut sembler modeste : à savoir que ces maladies doivent être étudiées séparément. Mais le principal message que nous voulons en tirer est l'importance de l'étude de la protéinase 3 pour ses fonctions biologiques propres et non comme simple antigène cible de l'auto-immunité. L'étude fondamentale des particularités structurales et fonctionnelles de la protéinase 3 a été entreprise dans le laboratoire depuis plus de 15 ans et a déjà permis de démontrer le rôle pro-inflammatoire de la protéinase 3 en particulier de sa forme associée aux membranes (Hajjar et al. 2010; Witko-Sarsat et al. 2010b). C'est le point de départ de mon travail, au cours duquel j'ai participé à la caractérisation biochimique de l'ancrage membranaire de la PR3 et étudié les conséquences fonctionnelles de son expression dérégulée dans les neutrophiles mais aussi dans les macrophages au cours de la GPA ainsi que son influence sur le système immunitaire à travers la clairance de cellules apoptotiques exprimant cette protéine.

ARTICLE 2

3. Les sérines protéases du neutrophile

Une des fonctions principales des neutrophiles recrutés sur un site inflammatoire est la lutte anti-bactérienne. Le neutrophile dispose d'un arsenal chimique important pour accomplir cette mission. La réponse offerte par le neutrophile est d'une part la production d'espèces réactives de l'oxygène faisant intervenir le complexe protéique de la NADPH oxydase et d'autre part une réponse non oxydative impliquant des protéines antibiotiques et des protéases, ces deux réponses étant physiquement concentrées dans le phagolysosome qui contient le microorganisme phagocyté par le neutrophile. L'importance de la réponse oxydative est illustrée par la susceptibilité aux infections des patients atteints de granulomatose chronique dont l'origine est un déficit fonctionnel du complexe de la NADPH oxydase. La réponse non oxydative repose quand à elle sur la fusion de granules du neutrophile avec le phagolysosome (Figure III.1).

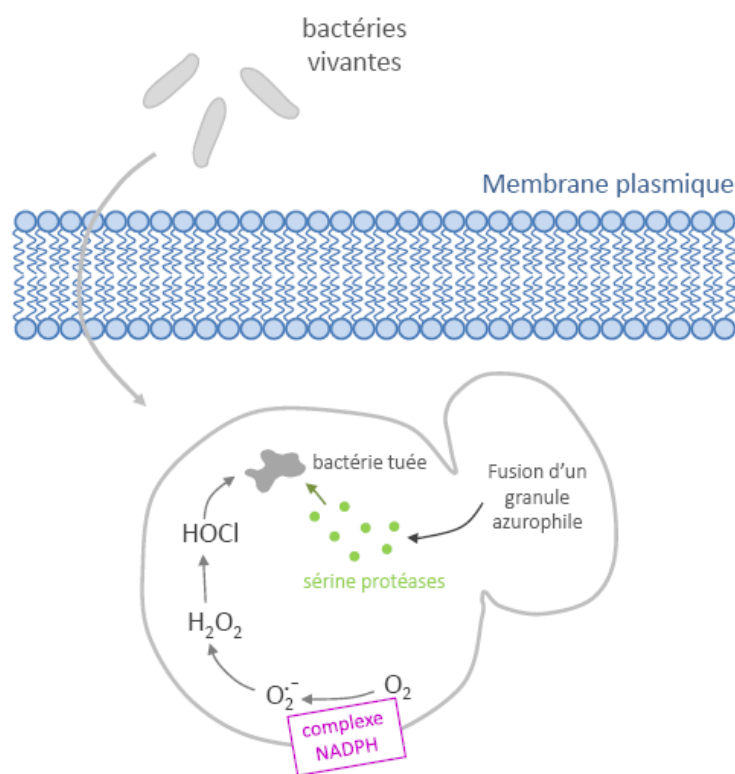


Figure III.1: Représentation schématique de la réponse oxydative dépendante du complexe NADPH oxydase et de la réponse non oxydative nécessitant la fusion des granules azurophiles avec le phagosome comportant les bactéries phagocytées.

3.1. Les granules du neutrophile

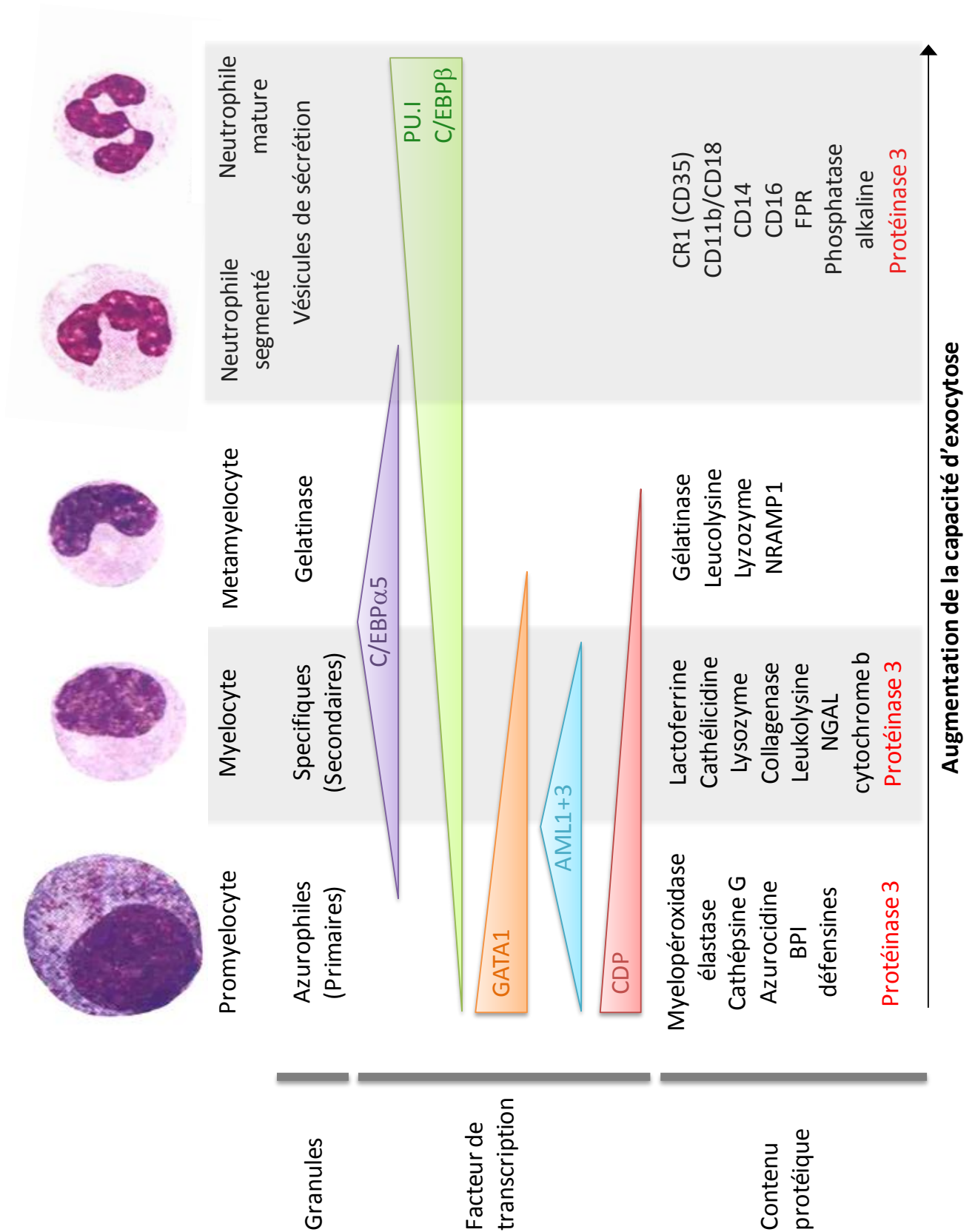
Il existe quatre types de granules dans le neutrophile: les granules azurophiles (ou primaires), les granules spécifiques (ou secondaires), les granules gélatinases (ou tertiaires) et les granules de sécrétion. Ces granules se différencient par leur contenu et par leur facilité à fusionner à la membrane plasmique pour libérer leur contenu. Le contenu des granules est lié au stade de la différenciation du neutrophile au cours duquel apparaissent ces granules. La biogénèse de chacun des granules est associée à un programme transcriptionnel particulier qui va conditionner le type de protéines synthétisées et donc contenues dans ce type de granule (Borregaard & Cowland 1997). Les granules azurophiles se forment durant le stade promyélocytaire, les secondaires au stade myélocyte, les tertiaires au cours du stade métamyélocyte et enfin les vésicules de sécrétion apparaissent avec les cellules segmentées. Le contrôle du programme transcriptionnel par différents facteurs de transcription et les principales protéines qui sont présentes dans les différents types de granules sont représentés sur la figure III.2. La PR3 sérine protéase marque très clairement sa différence, en effet selon la théorie du « targeting by timing » cette protéine ne devrait se trouver que dans les granules azurophiles or un travail précédent du laboratoire a permis de démontrer qu'elle pouvait être détectée à la membrane et dans les vésicules de sécrétion (Witko-Sarsat et al. 1999a). Le mécanisme exact de cette atypie n'est pas connu, mais la capacité de la PR3 à pouvoir se lier aux membranes n'est probablement pas étrangère à cette répartition (Cf Partie IV).

3.2. Biologie des sérines protéases du neutrophile

Les sérines protéases qui sont contenues dans les granules azurophiles comprennent l'élastase, la cathepsine G et la protéinase 3. Ces granules sont principalement impliqués dans la fusion avec le phagolysosome. Ces sérines protéases agissent de concert avec la myeloperoxydase, les défensines et les BPI (bacterial permeability-increasing protein). Le rôle des sérines protéases dans la lutte infectieuse a été démontré *in vivo* par plusieurs modèles basés sur la déplétion d'une ou plusieurs sérines protéases. Ces études ont aussi permis de préciser le type de pathogènes ciblés par les différentes sérines protéases comme les bacilles à Gram négatif pour l'élastase (Belaouaj et al. 1998) et le staphylocoque doré pour la cathepsine G (Reeves et al. 2002). Les sérines protéases sont définies par l'existence d'une triade catalytique impliquant une histidine, un acide aspartique et une sérine. Les

gènes codant pour l'élastase et la PR3 font partie d'un cluster sur le chromosome 19 chez l'homme (Zimmer *et al.* 1992), dans lequel on trouve aussi le gène de l'azurocidine une protéine proche structurellement des serines protéases mais inactive (Chertov *et al.* 1997). La cathepsine G est codée par un gène présent sur le chromosome 14 dans un cluster comprenant les gènes du granzyme B et H (Caughey *et al.* 1993). Ces serines protéases présentent une grande homologie de séquence avec les granzymes, chymases et tryptases (Pham 2006). L'adressage de ces protéines vers les granules azurophiles correspond à l'expression de leur ARNm lors du stade promyélocytaire alors que l'expression de ces ARNm est inhibée dans le neutrophile mature (Garwicz *et al.* 2005). Ces sérines protéases sont synthétisées à l'état de zymogène qui nécessite deux étapes distinctes de clivage sur leur partie N-terminale pour devenir actives. La première étape réalisée par une peptidase clive le peptide signal qui va permettre l'adressage aux granules puis la DPPI (dipeptidyl peptidase I ou cathépsine C) va cliver le dipeptide de la pro-forme permettant l'activation de l'activité catalytique (Garwicz *et al.* 1998). Une étape de clivage sur la partie C-terminale permet la liaison à la molécule de transport AP3. Sans cette étape, il a été montré que l'élastase serait adressée inactive à la membrane (Benson *et al.* 2003). Nous ne savons pas si ce mécanisme est fonctionnel pour la PR3 et la cathepsine G mais le « processing » de la partie C-terminale a été décrit pour ces deux protéines (Pham 2006). Une partie des protéines synthétisées échappent à l'adressage vers les granules, ce sont des protéines matures mais aussi des pro-formes pour lesquelles le clivage du dipeptide en N-terminal n'a pas eu lieu. Si cet adressage manqué aux granules azurophiles est un défaut du système d'adressage ou bien si ces protéines ont un rôle autre n'est pas connu.

Figure III.2 (page ci-contre) : Biosynthèse des granules du neutrophile. Chaque stade est associé à un programme transcriptionnel contrôlé par différents facteurs de transcription. Les granules qui sont formés durant chaque étape contiennent les protéines dont la synthèse correspond au stade de maturation du neutrophile. Les granules se différencient par leur contenu mais aussi par leur facilité à fusionner avec la membrane. Cette facilité augmentant avec l'apparition tardive des granules au cours de la maturation. La PR3 ne respecte pas le dogme du « Targeting by Timing » qui voudrait qu'elle ne soit trouvée que dans les granules azurophiles. En fait cette protéine se retrouve dans la plupart des compartiments granulaires (adapté de Borregaard & Cowland 1997). FPR : formyl peptide receptor, NGAL : neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NRAMP: natural-resistance-associated macrophage 1



3.3. La protéinase 3 une sérine protéase aux propriétés singulières

3.3.1. Aspects structuraux

La PR3 est une protéine de poids moléculaire de 29-32kD qui se présente sous la forme d'un triplet d'isoformes de glycosylation différentes sur un gel SDS-PAGE (van der Geld *et al.* 2001). La PR3 et l'élastase sont des protéines de la famille des chymotrypsin-like, mais leur proximité ne les empêche pas de se distinguer sur plusieurs points (Hajjar *et al.* 2010). En effet, la PR3 possède des substrats intracellulaires qui lui sont propres impliqués dans la prolifération ou l'apoptose des neutrophiles. De plus, elle est exprimée à la membrane externe des neutrophiles à l'état basal mais aussi dans les vésicules de sécrétion (Witko-Sarsat *et al.* 1999a) contrairement à ses homologues (élastase, cathépsine G) et d'un point de vue physiopathologique elle est la cible de l'auto-immunité dans la granulomatose avec polyangéite ce qui n'est pas le cas des autres sérines protéases. La PR3 partage 56% de sa séquence protéique avec l'élastase du neutrophile humain, toutefois ces protéines présentent des différences notables du point de vue structural comme le montre la cartographie du potentiel électrostatique de surface de ces deux protéines cationiques (Figure III.3).

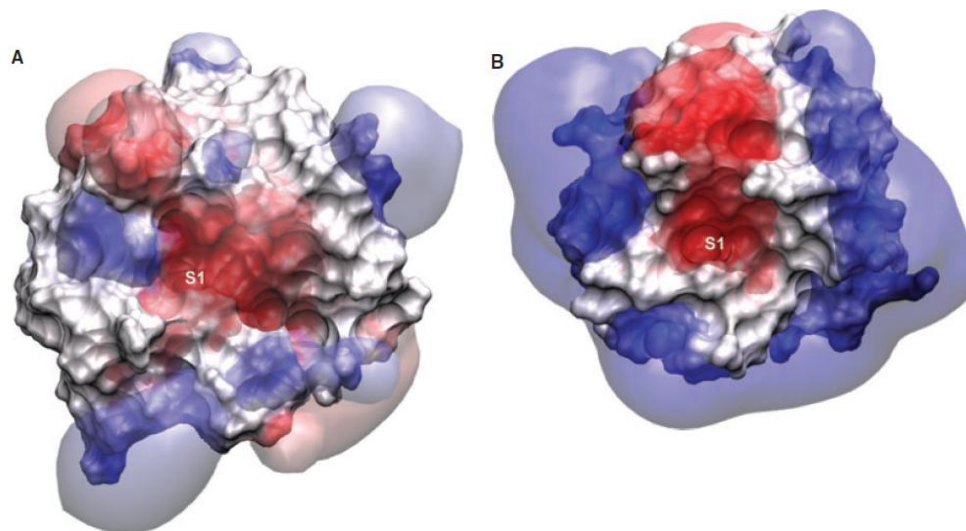


Figure III.3 : Potentiel électrostatique de surface de la PR3 humaine (A) et de l'élastase du neutrophile humain (B). Le potentiel électrostatique calculé est représenté avec un code couleur correspondant à la valeur du potentiel en unité thermique: +5 kT (bleu), +1 kT (bleu transparent), 0 kT (blanc), -1 kT (rouge transparent), -5 kT (rouge). (D'après Hajjar *et al.* 2010)

La structure de surface électrostatique de la PR3 révèle des patches de charges positives alternant avec des zones négatives (Figure III.3A) alors que l'élastase présente une répartition uniforme de charges positives excepté pour le site actif (Figure III.3B S1). Cette caractéristique électrostatique a été retrouvée chez de nombreuses protéines se liant à la membrane plasmique (Mulgrew-Nesbitt *et al.* 2006). L'environnement électrostatique de la poche catalytique influence aussi la reconnaissance des substrats. En utilisant une approche bioinformatique il a été possible de faire une carte de reconnaissance des sites catalytiques de la PR3 et de l'élastase. Cette analyse a permis de mettre en évidence des différences majeures dans le type de séquences préférentielles des sites catalytiques des deux sérines protéases (Hajjar *et al.* 2010). Une illustration de cette spécificité de substrat est le clivage de p21^{waf1/CIP1} par la PR3 favorisant la prolifération cellulaire mis en évidence dans le laboratoire (Witko-Sarsat *et al.* 2002). Nonobstant ces différences de substrat, la différence majeure entre la PR3 et l'élastase réside dans leur capacité de liaison à la membrane plasmique. La question de la liaison d'une sérine protéase à la membrane rejoint celle de la capacité des sérines protéases d'agir en extracellulaire en raison de la présence d'inhibiteurs. En effet, la présence d'inhibiteurs puissants des sérines protéases dans le plasma semble rendre l'activité enzymatique extracellulaire de ces protéases négligeable. Cependant la sécrétion des protéases du neutrophile peut se faire dans un tissu enchâssé des fibres de la matrice extracellulaire, qui ne permettent pas la diffusion des inhibiteurs de haut poids moléculaires en provenance du plasma. De plus la quantité de protéase peut dépasser localement les capacités d'inhibition des inhibiteurs. La possibilité de liaison à la membrane offre alors, en raison de l'encombrement stérique, une possibilité de maintenir une activité catalytique pour des sérines protéases sécrétés à l'abri des inhibiteurs. Cela a été montré pour l'élastase et la cathepsine G (Owen *et al.* 1995). Le mécanisme de liaison à la membrane proposé repose sur une interaction électrostatique, avec la possibilité de décrocher ces protéines par une modification de la charge de la membrane. La PR3 quant à elle semble ne pas se conformer à ce schéma d'interaction faible électrostatique. En effet l'expression membranaire de cette protéine n'est pas uniquement ionique (Witko-Sarsat *et al.* 1999a). De plus cette sérine protéase est constitutivement exprimée à la membrane des neutrophiles au repos ce qui n'est pas le cas de l'élastase ou de la cathepsine G (Halbwachs-Mecarelli *et al.* 1995). De multiples partenaires protéiques ont été proposés pour expliquer la liaison de la PR3 à la membrane : CD11b/CD18 (David *et al.* 2003), CD16 (David *et al.* 2005)

et CD177 (Bauer *et al.* 2007 ; von Vietinghoff *et al.* 2007). PR3 a aussi été localisée dans les rafts lipidiques (Fridlich *et al.* 2006). De manière intéressante et contrairement à ses homologues la PR3 est capable de s'insérer dans des vésicules lipidiques (Goldmann *et al.* 1999). De façon intéressante, il s'est avéré que la PR3 pouvaient s'associer à différentes protéines selon que son expression membranaire était constitutive, déclenchée par la dégranulation ou par l'apoptose (Witko-Sarsat *et al.* 2010b). Les études de modélisation moléculaires dynamiques ont permis de montrer que la PR3 est capable de lier des membranes neutres ou anioniques alors que l'élastase ne pouvait que se lier à des membranes chargées négativement (Hajjar *et al.* 2010). L'étude du mécanisme de cette liaison sera discutée dans la partie résultat (partie IV). Une des particularités de l'expression membranaire de la PR3 sur le neutrophile est son caractère bimodal. En effet, pour un individu donné le pourcentage de neutrophile exprimant à l'état basal la PR3 est fixe mais peut varier de 0 à 100% (Halbwachs-Mecarelli *et al.* 1995). Il s'agit d'une expression déterminée génétiquement (Witko-Sarsat *et al.* 1999b ; Schreiber *et al.* 2003). Une seule autre protéine possède cette propriété et présente la même distribution bimodale sur le neutrophile humain il s'agit de CD177, aussi appelée NB1 (Bauer *et al.* 2007). Nous reviendrons dans la partie résultat (partie V) sur le rôle de CD177 dans l'expression membranaire de la PR3. Notons de plus que chez les patients atteints de vascularite à ANCA ayant une atteinte rénale prédominante le pourcentage de neutrophiles mPR3+ est plus important que celui de témoins sains (Witko-Sarsat *et al.* 1999b). Ce résultat a été retrouvé par d'autres groupes qui ont montré que cette répartition pouvait aussi être présente dans d'autres pathologies auto-immunes comme le lupus érythémateux disséminé qui n'est pas associé à la présence d'ANCA (von Rossum *et al.* 2007).

3.3.2. Rôle dans la différenciation myéloïde

La protéinase 3 est aussi appelée myéloblastine (Bories *et al.* 1989). A l'origine, la myéloblastine a été décrite comme une serine protéase dont l'inhibition de l'expression stade promyélocytaire déclenchait la différenciation. De plus, l'expression de la PR3 dans les progéniteurs hématopoïétiques est sous le contrôle du G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) via un mécanisme faisant intervenir le facteur de transcription PU.1 (Lutz *et al.* 2000). La surexpression de PR3 dans des progéniteurs hématopoïétiques favorise une croissance indépendante des facteurs de croissance (Lutz *et al.* 2000). Or le G-CSF est un

facteur de croissance essentiel dans la production des neutrophiles, en stimulant la croissance des progéniteurs et en favorisant la libération des neutrophiles de la moelle osseuse (Semerad *et al.* 2002). De plus, au stade promyelocytaire l'expression de la PR3 est contrôlée négativement permettant la différenciation et l'arrêt de la croissance. En effet l'abolition de l'expression de la PR3 dans des cellules de leucémie promyelocytaire se traduit par une différenciation et un arrêt de la croissance tumorale (Bories *et al.* 1989). Au stade promyélocytaire de petites quantités de pro-forme de la PR3 sont sécrétées, cette pro-forme est aussi capable d'inhiber la croissance des progéniteurs granuleux mais de manière réversible sous GM-CSF (Skold *et al.* 1999). Le lien entre G-CSF et expression de la PR3 dans le neutrophile sera explorée dans la partie VI, dans laquelle nous montrerons comment la PR3 pourrait réguler sa propre expression dans un contexte inflammatoire comme celui de la granulomatose avec polyangéite.

3.3.3. PR3 et inflammation

La PR3 est une sérine protéase dont la plupart des fonctions décrites sont pro-inflammatoires. En effet, la PR3 est capable d'augmenter la sécrétion des formes solubles du TNF- α et de l'IL-1 β (Coeshott *et al.* 1999). La PR3 peut cliver l'IL-8, ce qui résulte dans la production d'une forme tronquée au niveau N-terminal associée à une activité biologique accrue (Padrines *et al.* 1994) et elle peut inactiver le C1 inhibiteur (Leid *et al.* 1993). La PR3 se lie aussi à l'IL-32, cytokine responsable de la production de TNF- α , d'IL-8 et de MIP-2 par un grand nombre de cellules. Cette liaison est indépendante de l'activité catalytique mais la PR3 peut toutefois cliver l'IL-32 ce qui donne une augmentation de sa capacité à stimuler la sécrétion d'IL-8 ou de MIP-2 (Novick *et al.* 2006). L'IL-33, qui a des fonctions multiples et notamment une fonction alarmine, peut être « processée » par la PR3. De manière similaire à l'IL-1 β et l'IL-18, l'IL-33 est produite sous la forme d'un précurseur qui nécessite un clivage pour permettre sa sécrétion sous forme mature (Schmitz *et al.* 2005). La PR3 est capable de cliver la pro-IL-33 pour donner une forme mature active induisant par exemple la sécrétion de MCP-1 en se liant à ST2 (Bae *et al.* 2012). Toutefois dans ce travail il était noté que si la PR3 est laissé de manière prolongée en contact avec l'IL-33 la forme mature est finalement dégradée, ce résultat rend l'interprétation du rôle de PR3 vis-à-vis de l'IL-33 difficile dans un contexte inflammatoire. La plus part de ces travaux ont été réalisés *in vitro*, la validation du caractère pro-inflammatoire de la PR3 a été étudiée *in vivo* chez le Hamster. L'instillation

intra trachéale de PR3 résulte en l'apparition d'un emphysème 30 semaines plus tard (Kao *et al.* 1988). Ce modèle a permis de confirmer la possibilité pour la PR3 de dégrader des composants de la matrice extracellulaire comme le collagène IV ou la fibronectine favorisant ainsi le processus inflammatoire. Toutefois ce modèle présentait des limites car il était basé sur l'instillation de grandes quantités de sérine protéase sans que la présence physiologique d'inhibiteurs naturels comme l' α 1-antitrypsine ne soit adaptée. Une autre étude conduite chez la souris double déficiente pour la PR3 et l'élastase a démontré l'implication de ces sérines protéases dans la réponse inflammatoire aux immuns complexes, ce qui est illustré par l'accumulation dans ces souris de progranuline, protéine anti-inflammatoire. Cette accumulation était absente chez les souris contrôles qui présentaient une infiltration neutrophilique majeure en réponse aux immuns complexes (Kessenbrock *et al.* 2008). Ce résultat intéressant pose néanmoins la question de la transposition de résultats obtenus pour la PR3 murine vers la PR3 humaine, nous reviendrons plus loin sur cette question. Nous avons vu que la PR3 favorise l'action pro-inflammatoire de plusieurs cytokines, mais elle peut aussi indirectement induire leur sécrétion. En effet, les sérines protéases sont susceptibles de catalyser l'activation des récepteurs PAR (Proteinase-Activated Receptors), membres d'une famille de récepteurs couplés aux protéines G présentant un site de clivage pour les sérines protéases sur leur partie N-terminale. Ce clivage permet à la séquence N-terminale modifiée d'activer le récepteur (Coughlin & Camerer 2003). La capacité de la PR3 à activer différents types cellulaires via PAR2 a été démontrée pour les plaquettes (Renesto *et al.* 1994), les cellules endothéliales (Steppich *et al.* 2008) et enfin les cellules dendritiques. La maturation des cellules dendritiques via PAR2 par la PR3 a, de plus, été associée à une réponse Th1 accrue (sécrétion IFN- γ) dans des expériences de co-cultures entre des cellules dendritiques traitées par la PR3 et des lymphocytes T CD4⁺ auto-réactifs contre la PR3 (Csernok *et al.* 2006 ; Jiang *et al.* 2010).

3.3.4. Les inhibiteurs de la PR3

L'activité catalytique des sérines protéases est régulée de manière précise par des inhibiteurs appartenant à la famille des SERPINs (SERine Protease INhibitors). Le principal inhibiteur de la PR3 est l' α 1-antitrypsine (AAT). Cet inhibiteur puissant de la PR3 (et de l'élastase) est codé par un gène polymorphe qui présente plus de 75 allèles. Le phénotype associé peut varier d'une expression normale (allèle M) à un déficit quantitatif sévère (allèle

Z). Certains phénotypes sont associés à un déficit fonctionnel dans lesquels la fixation est conservée mais l'inhibition de la fonction catalytique défectueuse. Le déficit génétique sévère en AAT est associé à un large spectre de manifestations cliniques comme l'emphysème panlobulaire et une cirrhose hépatique (Silverman & Sandhaus 2009). Le phénotype déficient ZZ a aussi été associé à une prévalence accrue de la granulomatose avec polyangéite, illustration clinique de l'implication de l'activité catalytique de la PR3 dans la physiopathologie de cette maladie (Mahr *et al.* 2010). A côté de ces déficits génétiques, des déficits acquis sont possibles. En effet, dans un contexte inflammatoire pathologique l'AAT peut être inactivé par l'élastase (Abbink *et al.* 1993), des métalloprotéases (Visser *et al.* 1988) ou les espèces réactives de l'oxygène (Weiss 1989) permettant une activité accrue pro-inflammatoire de la PR3 en lien avec son activité catalytique. Les anticorps dirigés contre la PR3 peuvent aussi interférer avec l'interaction PR3-AAT (Dolman *et al.* 1993). La PR3 possède d'autres inhibiteurs comme l'élafine (Wiedow *et al.* 1991) ou l' α_2 -macroglobuline (Bergenfeldt *et al.* 1992) dont le rôle est toutefois secondaire. Contrairement à l'élastase ou la cathepsine G, la PR3 n'est pas inhibée par le SLPI (Secretory Leuko Protease Inhibitor) (van der Geld *et al.* 2001). Le tropisme d'une maladie comme la granulomatose avec polyangéite pour les voies aériennes supérieures et le fait qu'il s'agisse de structures anatomiques présentant les concentrations les plus fortes de SLPI dans l'organisme n'est probablement pas anodin (Rao *et al.* 1991).

3.3.5. La PR3 murine

Dans l'interprétation des données *in vivo* obtenues sur la PR3 il faut garder à l'esprit que la PR3 humaine ne possède qu'une homologie de séquence avec la PR3 murine de 63%. De manière générale la PR3 de souris se comporte plutôt comme l'élastase. En effet, la PR3 humaine et la PR3 murine présentent des différences notables en termes de substrats la PR3 murine étant incapable de lier des substrats comportant des groupes acides comme l'acide aspartique ou un acide glutamique (Hajjar *et al.* 2010). Ces deux protéines présentent des potentiels électrostatiques de surface très différents (Figure III.4), la PR3 humaine étant plus basique (Hajjar *et al.* 2010). Mais la différence la plus importante est la possibilité de se lier aux membranes ce dont la PR3 murine est incapable, ce qui peut être rapporté à des interactions électrostatiques différentes vis à vis des têtes polaires des phospholipides (Hajjar *et al.* 2007) mais surtout à l'existence pour la PR3 humaine d'un patch hydrophobe

que nous discuterons dans la partie IV. La PR3 murine ne partage pas non plus le spectre d'inhibiteur de la PR3 humaine qui n'est pas inhibée par l'aprotinine mais l'est par l'égléine C, comportement opposé à celui de la PR3 murine (Wiesner *et al.* 2005).

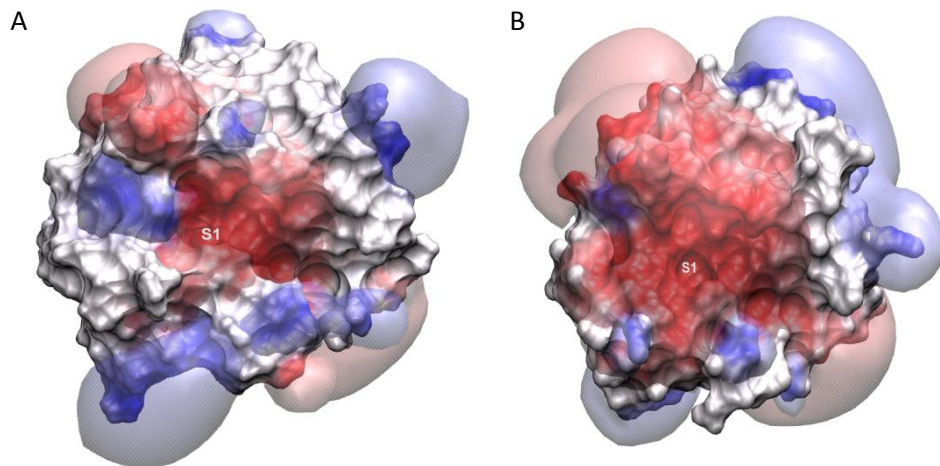


Figure III.4 : Potentiel électrostatique de surface de la PR3 humaine (A) et la PR3 murine (B) . Le potentiel électrostatique calculé est représenté avec un code couleur correspondant à la valeur du potentiel en unité thermique: +5 kT (bleu), +1 kT (bleu transparent), 0 kT (blanc), -1 kT (rouge transparent), -5 kT (rouge). (D'après Hajjar 2007).

RESULTATS

PARTIE IV : Insertion membranaire de la PR3 - Mécanismes et fonctions

1. Existence d'un patch hydrophobe permettant l'ancrage membranaire de la PR3 : Conséquences fonctionnelles

Comme nous l'avons décrit précédemment une des particularités de la PR3 est son expression membranaire. Le travail effectué par l'équipe de Bioinformatique de l'Université de Bergen en Norvège sous la direction de Nathalie Reuter a permis de mettre en évidence la présence de 4 acides aminés hydrophobes constituant une structure permettant l'ancrage dans la membrane dans la séquence de la PR3. Ces 4 acides aminés sont associés à 4 autres acides aminés chargés qui permettent l'orientation correcte de la PR3 en regard d'une membrane chargée. A la différence de la PR3 l'élastase ne peut se fixer sur une membrane que par l'intermédiaire d'une interaction électrostatique mais sans ancrage d'acides aminés dans la membrane (Figure IV.1). Nous avons voulu étudier expérimentalement ce mécanisme d'ancrage membranaire de la PR3 à l'aide de transfectant stables d'une lignée de cellules de rat (RBL) exprimant de la PR3 humaine et certains des mutants suggérés par modélisation moléculaire. Nous avons aussi étudié les conséquences fonctionnelles de l'expression des différentes PR3 mutées au niveau des acides aminés impliqués dans la liaison avec la membrane. Les résultats de cette étude constituent l'article 4.

2. Le modèle cellulaire RBL

Les neutrophiles étant des cellules primaires en fin de différenciation, elles ne se divisent pas et elles ont une durée de vie limitée après isolement. Toute manipulation génétique sur ces cellules est donc très difficile. Si certains avait rapporté la possibilité d'utiliser une transduction lentivirale pour introduire de l'ADNc dans les neutrophiles, une étude récente a montré qu'il s'agissait en fait d'une pseudo-transduction (Geering *et al.* 2011c). Pour étudier les différentes fonctions de la PR3 et les mécanismes impliqués, notamment, dans sa localisation membranaire nous avons eu recours à une lignée cellulaire de rat. Seules les lignées myéloïdes possèdent l'équipement enzymatique nécessaire permettant le « processing » de la PR3 sous forme mature. Depuis plusieurs années, le laboratoire a utilisé la lignée RBL (Rat Basophilic Cell Line) qui est une lignée présentant des caractéristiques à la

fois des basophiles et des mastocytes (Passante & Frankish 2009). Ces cellules sont capables d'exprimer après transfection le PR3 humaine mature ou ses mutants mais aussi les homologues que sont l'élastase ou la cathepsine G (Garwicz *et al.* 1997). Ces protéines n'étant pas exprimée dans les RBL, ces cellules permettent d'étudier leurs activités spécifiques. Après transfection la PR3 humaine est majoritairement localisée dans un compartiment granulaire mimant le comportement du pool majoritaire de PR3 dans les granules azurophiles du neutrophile humain. Cette lignée cellulaire permet donc d'étudier le phénomène de dégranulation (sans toutefois reproduire la complexité du compartiment granulaire du neutrophile), en utilisant le calcium ionophore A23187. Cette entrée de calcium libre intracellulaire induit une dégranulation proche de celle de basophile ou mastocyte « vrais » (Johnson *et al.* 1975). De façon plus inattendue, c'est dans ce modèle que le laboratoire a mis en évidence une expression membranaire de la PR3 à la surface des cellules apoptotiques, alors que dans les mêmes conditions, l'élastase n'était pas exprimée à la membrane (Durant *et al.* 2004). Cette expression de la PR3 a été ensuite confirmée sur le neutrophile apoptotique en l'absence de toute dégranulation (Kantari *et al.* 2007) démontrant ainsi que ce modèle cellulaire des RBL nous permettait d'étudier les différents mécanismes permettant d'exprimer la PR3 membranaire que sont la dégranulation et l'apoptose, tout en gardant à l'esprit que les RBL ne sont qu'un modèle cellulaire et non de vrais neutrophiles.

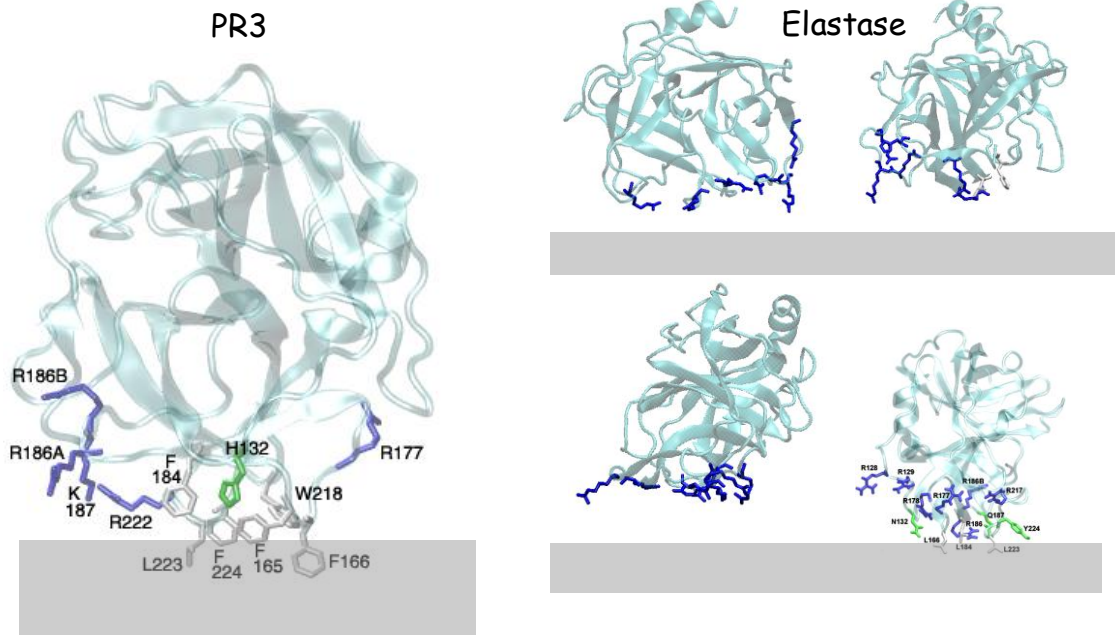


Figure IV.1 : Modélisation moléculaire de la protéinase 3 et de l'élastase du neutrophile humain. Les acides aminés chargés (en gris) et hydrophobes (en bleu) impliqués dans l'ancrage membranaire sur une membrane implicite chargée sont représentés. L'élastase quant à elle montre plusieurs possibilités d'interaction avec la membrane chargée mais sans insertion d'acides aminés dans la membrane (D'après Hajjar *et al.* 2008).

3. Article 3 : Analyse moléculaire de l'insertion membranaire de la protéinase 3, l'auto-antigène de la maladie de Wegener, dans les cellules RBL : implications sur son activité pathogénique

ARTICLE 3

PARTIE V : Interférence entre l'expression membranaire de la PR3 et la reconnaissance des cellules apoptotiques

1. Article 4 : La protéinase 3, l'auto-antigène de la granulomatose avec polyangéite, s'associe avec la calréticuline à la surface des neutrophiles apoptotiques, perturbe leur phagocytose par les macrophages et favorise l'inflammation

Dans l'article (article 3) précédent, nous avons mis en évidence le fait que la PR3 exprimée à la membrane au cours de l'apoptose n'était pas active catalytiquement. Se posait alors la question des conséquences éventuelles de l'expression de cette sérine protéase au cours de l'apoptose sur le processus de clairance des cellules apoptotiques par les macrophages et ce dans un cadre indépendant de son activité catalytique. Des travaux précédents avaient suggéré la possibilité d'une interférence entre l'expression de cette protéine et la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages (Kantari *et al.* 2007). C'est à cette question qu'est consacré l'article suivant (article 4). Nous avons mis en évidence dans ce travail une interaction entre la PR3 et la calréticuline qui un signal « eat-me » exprimé par les cellules apoptotiques et reconnu par le récepteur LRP (CD91) à la surface du macrophage. Nous discutons les conséquences fonctionnelles de cette interaction qui nous amène à étudier les conséquences sur le phénotype des macrophages après phagocytose de cellules apoptotiques exprimant la PR3.

ARTICLE 4

2. Résultats complémentaires

2.1 Interaction entre CD177 et PR3

Nous avons montré dans ce travail que l'expression de CD177 n'intervenait pas dans l'expression de PR3 au cours de l'apoptose sur des RBL. Cependant sur le neutrophile humain CD177 a été associé à l'expression basale de PR3 (il s'agit des deux seules protéines connues à présenter une répartition bimodale sur les neutrophiles Cf III. 3.3.1). Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent cette co-expression ne sont pas connus. CD177 est décrit comme un récepteur de la PR3 mais les mécanismes par lequel la PR3 va être sécrétée pour se lier à ce récepteur ne sont pas élucidés. Il est possible de formuler l'hypothèse selon laquelle la proforme inactive de la PR3 sécrétée durant la différenciation granulocytaire s'associerait à CD177 exprimé à la surface des myelocytes, metamyelocytes et des neutrophiles matures (Stroncek *et al.* 1990). Si la PR3 peut alors interagir directement avec CD177, nous aurions alors un scénario permettant d'expliquer la concordance des deux répartitions bimodales de ces protéines. C'est effectivement le cas comme nous l'avons démontré sur notre système RBL (Figure V.1) et comme d'autres équipes l'ont montré (Abdgawad *et al.* 2010).

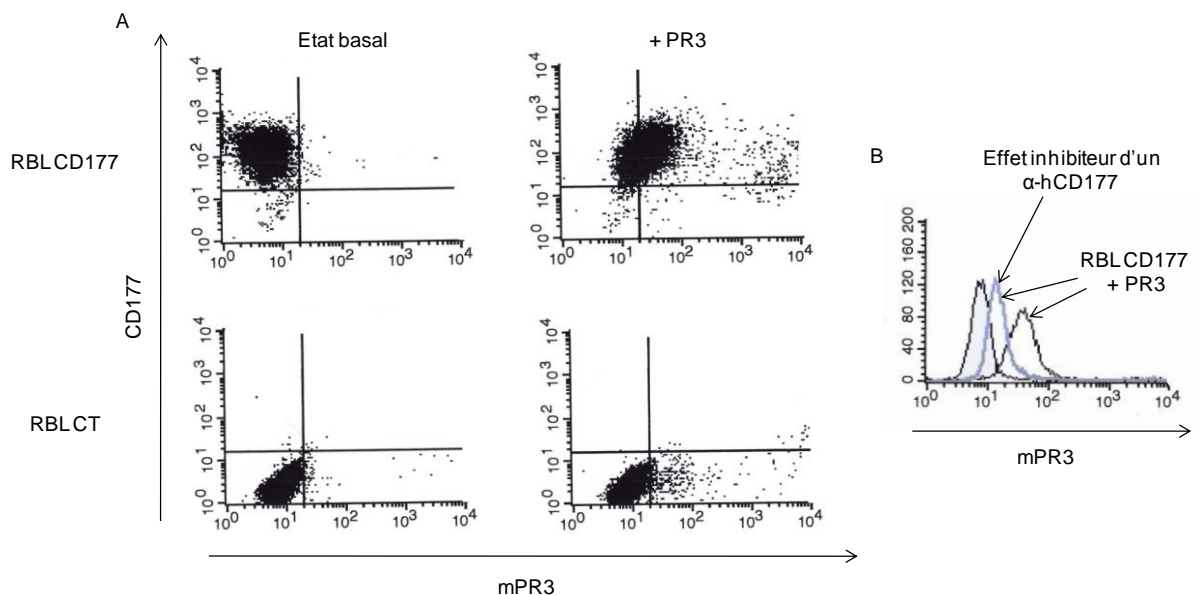


Figure V.1 : Des RBL transfectés et clonés exprimant de manière stable le CD177 humain (A quadrant haut gauche) sont exposés durant 3 heures à de la PR3 purifiée humaine (3μg sur 300 000 cellules dans 30μL à 4°C) ainsi que des RBL CT. L'expression de la PR3 humaine sur ces cellules non apoptotiques (état basal, bleu trypan <3%) est déterminée par un anticorps anti-PR3 (clone CLB12.8). Seules les cellules exprimant du CD177 humain sont capables de fixer la PR3 (A), fixation qui était inhibée en partie par une pré-incubation avec un anticorps anti CD177 humain (Serotec) (B).

2.2 Expression de la PR3 après apoptose induite par ultraviolet

Pour pouvoir étudier les conséquences de la phagocytose de cellules exprimant la PR3 sur le phénotype des macrophages, il est nécessaire de laisser les cellules apoptotiques en contact avec les macrophages pendant une durée relativement longue (de l'ordre de 24h). Dans ce contexte l'utilisation de gliotoxine pour induire l'apoptose des RBL pose problème car la libération de ce composé toxique dans le milieu provenant de cellules nécrotiques induit une mort chez les macrophages et fausse l'interprétation des cytokines sécrétées. D'autre part la présence de gliotoxine dans le milieu empêcherait d'utiliser ces surnageants issus de ce RBL exprimant ou non la PR3 pour étudier leurs effets biologiques sur d'autres types cellulaires. C'est pour cela que nous avons utilisé l'induction d'apoptose par ultraviolet. Le mécanisme d'induction de l'apoptose par la gliotoxine n'est pas connu malgré de multiples travaux (Gardiner *et al.* 2005). Le mécanisme d'induction par UV-B fait quand à lui intervenir de multiples voies : dégradation de l'ADN, activation de p53, signalisation par les récepteurs de mort (TNF-R, TRAIL-R, Fas), dépolarisation mitochondriale et libération de cytochrome C (Kulms & schwarz 2000). Il était donc nécessaire que l'on s'assure que l'apoptose induite par UV-B induisait une apoptose similaire entre les RBL CT et les RBL/PR3 et que d'autre part l'expression de PR3 était toujours présente au cours de l'apoptose. C'était effectivement le cas (Figure V.2).

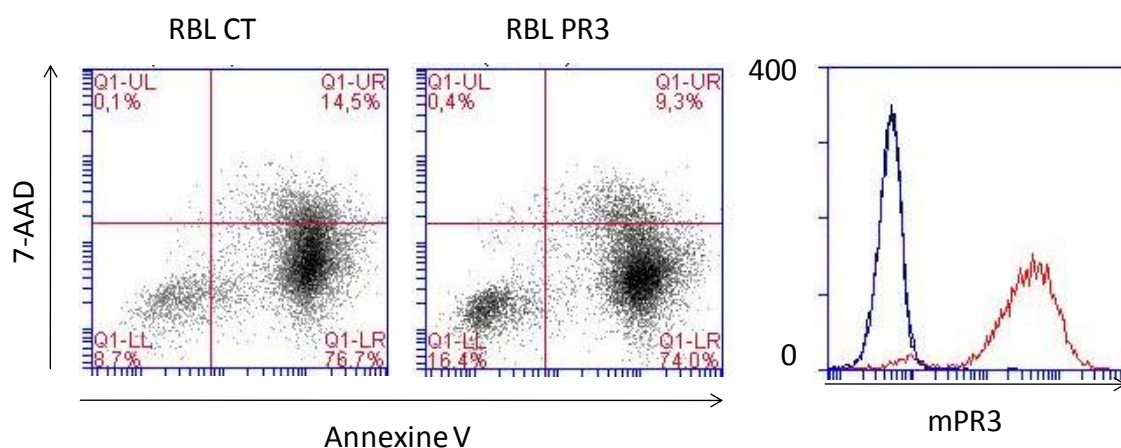


Figure V.2 : Analyse de l'expression d'annexin V (BD) et 7-AAD (BD) après 24h de l'exposition par UV-B (durée d'exposition 5 min) sur des RBL CT et RBL/PR3 (dot plots sur partie gauche). Les taux d'apoptose (AV+7AAD-) et de nécrose (AV+7AAD+) sont similaires (images représentatives de plus de 30 expériences). L'expression de la PR3 sur les mêmes cellules a été déterminée par un anticorps monoclonal anti-PR3 (clone CLB12.8) sur les RBL/PR3 (en rouge) comparé à un contrôle isotypique (noir) et aux RBL CT (bleu) (histogramme à droite).

2.3 Impact de l'expression de la PR3 sur la captation des cellules apoptotiques

Dans l'article 4 nous avons suggéré comme conséquence fonctionnelle de l'interaction entre la PR3 et la calréticuline que la captation des cellules apoptotiques exprimant PR3 pourrait être diminuée. Cependant l'effet quantitatif de cette inhibition était très modeste (Figure 5C). Une des explications que nous avançons dans l'article était le faible niveau d'expression de LRP sur les macrophages humains différenciés *in vitro* en sérum autologue. Pour répondre à cette question, j'ai utilisé une différenciation en M-CSF de monocytes sanguins pour obtenir des macrophages qui expriment un niveau de LRP bien supérieur à ceux différenciés en sérum autologue. J'ai ensuite exposé ces macrophages à des RBL apoptotiques exprimant ou non la PR3 et j'ai incubé les macrophages avec ou sans anti-LRP (BD) ou un contrôle isotypique (Figure V.3). Le blocage de la voie LRP permet bien une inhibition de la captation des cellules apoptotiques, mais l'inhibition n'est pas complète ceci pouvant être dû à un blocage insuffisant de l'anticorps ou plus vraisemblablement à l'existence de plusieurs voies de reconnaissance des cellules apoptotiques (Cf II 1.2). Dans cette série d'expériences aucun effet d'inhibition de la captation des cellules apoptotiques exprimant la PR3 n'est observé comparativement aux cellules contrôles. J'ai confirmé ce résultat par un comptage en immunofluorescence et refait une série d'expériences identiques sur des macrophages péritonéaux murins mobilisés par thioglycollate. Là encore la captation de cellules apoptotiques analysée en FACS ne montre aucune différence entre les cellules exprimant ou non la PR3.

Ces résultats divergent de ceux que nous avons obtenus pour les neutrophiles humains apoptotiques avec des macrophages différenciés en sérum autologue ou de l'analyse de la captation *in vivo* par des macrophages résidents (Article 4). Il est possible que l'effet de l'inhibition de la captation de la PR3 dépende du type de macrophage (conclusion logique des résultats précédents). Il faut toutefois noter que ces résultats sont similaires à ceux obtenus sur des macrophages différenciés en M-CSF ayant phagocyté des neutrophiles de témoins sains et de patients atteint de GPA pour lesquels aucune différence de captation n'était observée (Ohlsson *et al.* 2012). La discordance des premiers résultats notamment *in vivo* pouvait provenir d'un aspect cinétique en effet dans cette expérience l'analyse de la phagocytose se faisait à 30 min, ce qui diffère des résultats *in vitro* obtenus à 2 heures. C'est

pour cela que je me suis intéressé à la cinétique en temps réel de la captation des cellules apoptotiques en utilisant une technique de vidéo-microscopie (time-lapse).

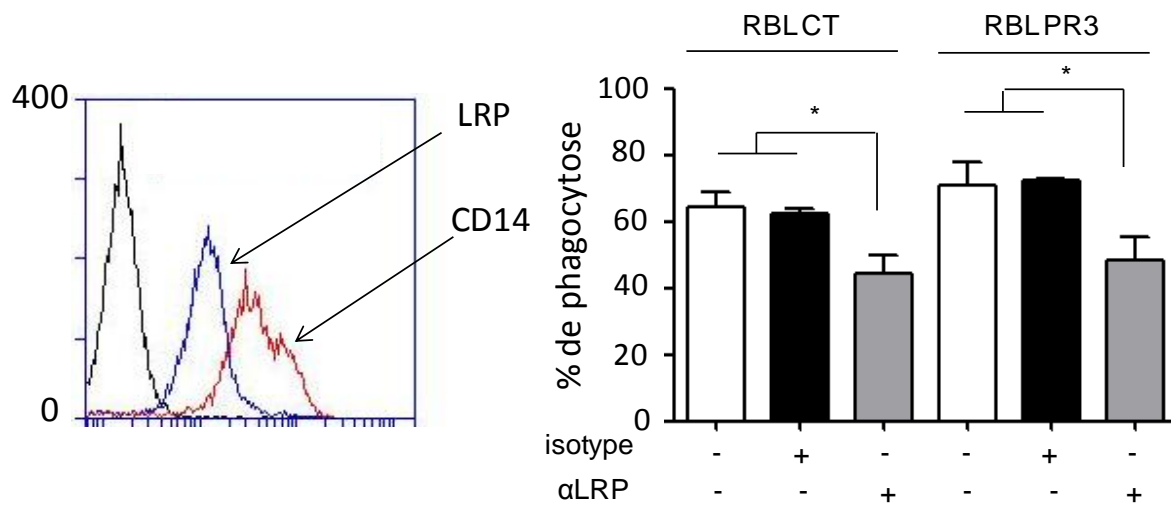


Figure V.3 : Les macrophages obtenus par différenciation de monocytes humains par M-CSF (50ng/mL, Miltenyi Biotec) ont une expression forte de LRP (anti-CD91, BD). Expérience de phagocytose avec des RBL apoptotiques (UV-B, marqués au TAMRA) sur 2 heures. L'inhibition de la voie LRP permet une diminution de la captation des cellules apoptotiques. La PR3 ne modifie pas la captation des cellules apoptotiques qui l'expriment. (n=3 *p<0.05 Wilcoxon paired rank test).

2.4 Cinétique en temps réel de la captation des cellules apoptotiques

Pour étudier la cinétique de captation par les macrophages d'une cellule apoptotique j'ai utilisé des macrophages dérivés de monocytes circulant humain que j'ai différencié in vitro par M-CSF et GM-CSF (50ng/mL pour les deux, Miltenyi Biotec). A J8 une expérience de phagocytose est effectuée avec des RBL CT ou RBL PR3 marqués au TAMRA. Les macrophages ont été différenciés sur des plaques μ Dish (iBidi 35 mm) conçues pour l'imagerie en épifluorescence. Un enregistrement time-lapse est effectué avec une image prise toutes les 30 secondes avec un objectif huile 40x sur un microscope à champ large de type Zeiss Axio Observer.Z1. Les cellules étaient placées dans une chambre thermostatée à 37°C, en air humide avec apport de CO₂. Les enregistrements ont été effectués sur des temps allant de 2 heures à 5 heures, 3 expériences différentes pour chaque type de RBL ont été effectuées. Le temps de captation a été défini comme le temps entre un contact fixe entre un macrophage et une cellule apoptotique et l'instant de phagocytose complète de la cellule (Figure V. 4).

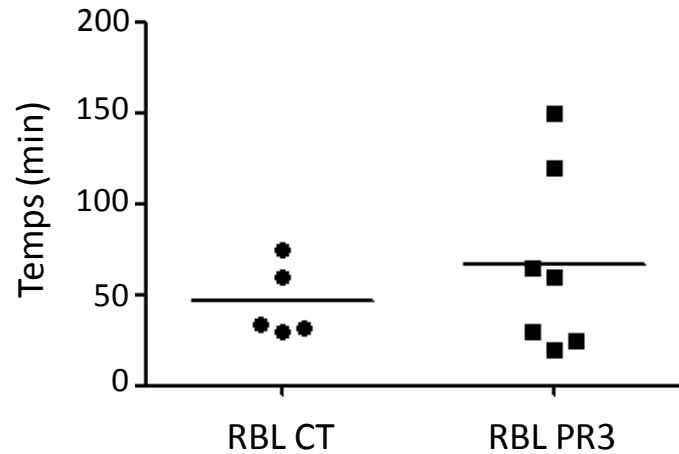


Figure V.4 : Durée d'une phagocytose mesurée à l'aide des enregistrements en time-lapse pour des RBL CT ou RBL PR3 par des macrophages différenciés en M-CSF et GM-CSF. Aucune différence n'apparaît entre les deux conditions. On note en revanche la très grande variance des valeurs de durée d'une phagocytose.

Ces expériences n'ont pas mis en évidence de différence concernant la durée du phénomène de phagocytose entre une cellule apoptotique exprimant ou non de la PR3. Par contre la diversité des comportements de phagocytose des macrophages est un résultat très intéressant. Un des phénomènes le plus démonstratif est la réorientation d'une cellule apoptotique par un macrophage lors de son contact avec celui-ci (Figure V.5). Cette observation soulève la question suivante : est-ce que toute la surface du macrophage possède la même capacité de phagocytose ou bien certaines zones sont-elles plus propices ? On peut facilement imaginer que la structure du cytosquelette sous-jacente influence la capacité de phagocytose, ce qui compléterait le modèle présenté dans la partie II (Figure II.3).

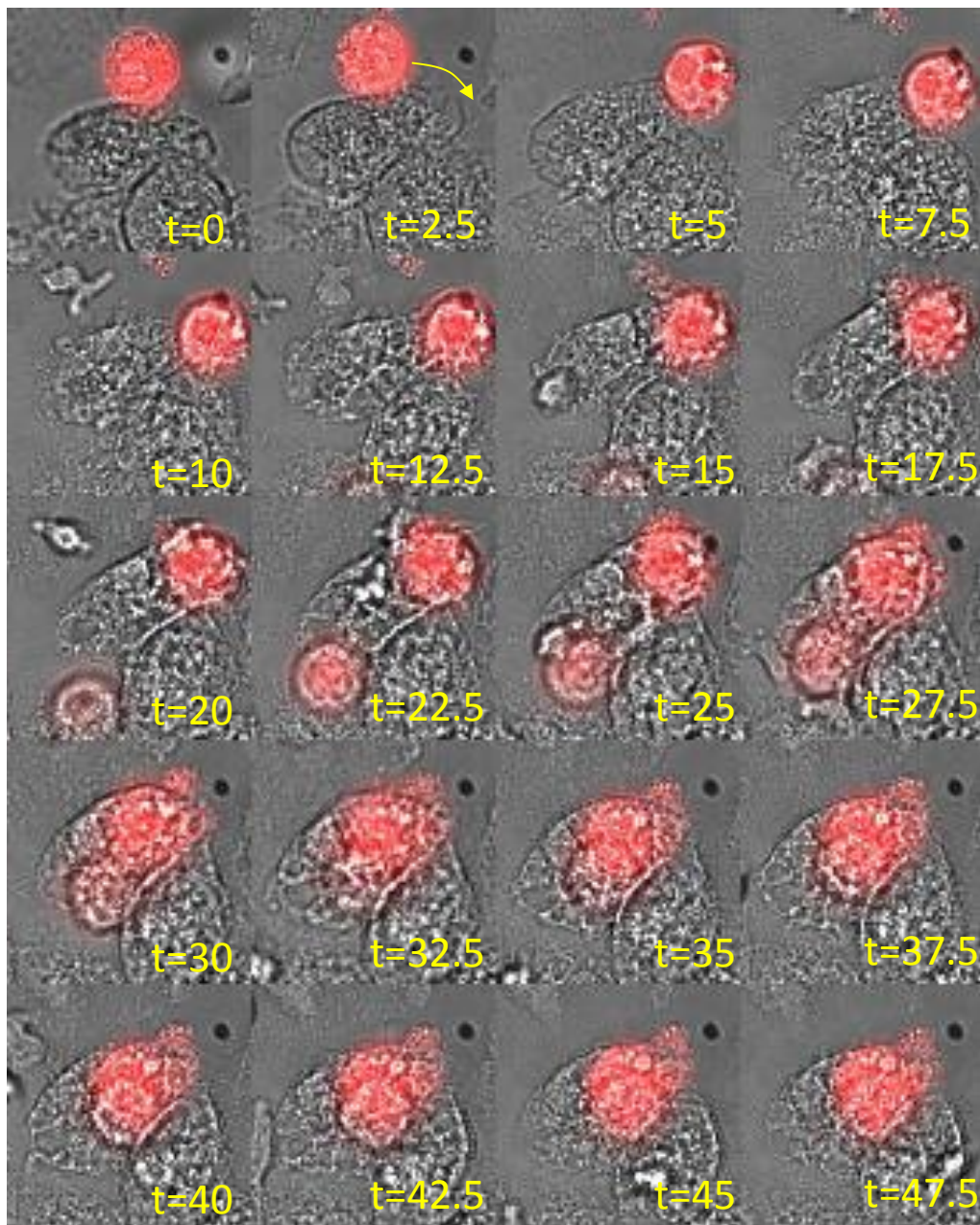


Figure V.5 : Sélection d'images issues d'une vidéo-microscopie d'un macrophage phagocytant une cellule RBL CT apoptotique marquée au TAMRA (unité de temps = minute). Dans les 5 premières minutes le contact latéral de la cellule apoptotique est suivi d'une réorientation dans l'axe de longueur maximal du macrophage. La phagocytose débute entre t=5 et t=7.5 min et se termine avec la formation du phagosome à t ≈ 30 min.

Ce film illustre la difficulté de définir avec précision la durée d'un phénomène dynamique comme la phagocytose et notamment le début correspondant à l'accrochage de la cellule apoptotique au macrophage. Toutefois l'erreur que nous commettons dans l'appréciation de cet instant est de l'ordre de la minute, or les durées mesurées étaient toutes supérieures à plusieurs dizaines de minutes. Un autre phénomène tout aussi fascinant est la possibilité pour un macrophage d'attraper une cellule apoptotique et de la tracter vers sa membrane pour la phagocytter (Figure V.6).

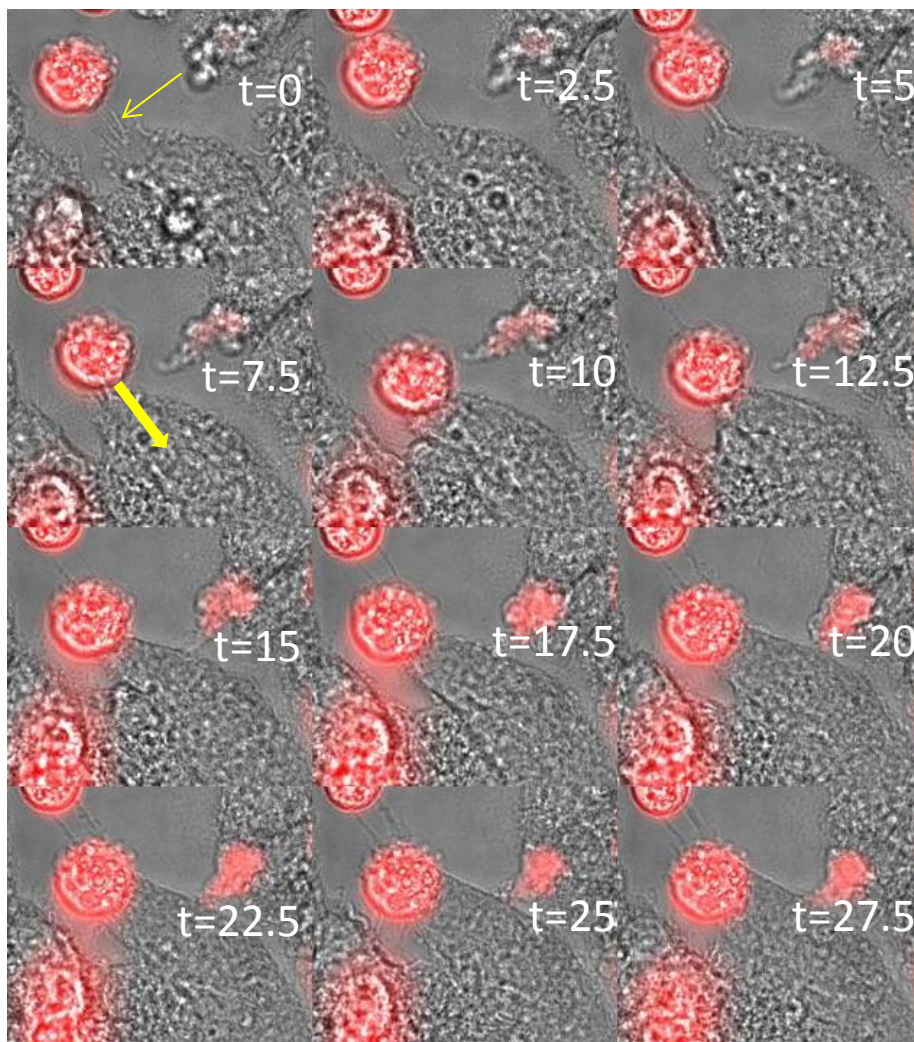


Figure V.6 : Sélection d'images issues d'une vidéo-microscopie d'un macrophage phagocytant une cellule RBL CT apoptotique marquée au TAMRA (unité de temps = minute). On observe des lamellipodes (flèche à $t=0$) qui se dirigent vers la cellule apoptotique. Ces lamellipodes vont tracter la cellule apoptotique vers le macrophage (flèche pleine à $t=7.5$) et d'autres vont poursuivre leur progression sous la cellule apoptotique. Le temps de phagocytose pour cette cellule sera mesuré > 2 heures.

Grâce à ce film, on peut mesurer l'ordre de grandeur des forces développées par un macrophage pour tracter une cellule apoptotique. En effet, en considérant que la traction se fait à vitesse constante on se retrouve avec un équilibre de force entre la force de traction du filament de membrane et la force de frottement visqueux que subit la cellule tractée en supposant qu'il n'y a aucune force d'adhésion sur le substrat de cette cellule. D'où

$$F_{traction} \sim 6\pi\eta Rv \sim 6\pi\eta \frac{R^2}{\delta t} \sim 10^{-2} pN$$

Qui n'est autre que la force de Reynolds avec les valeurs suivantes tirées de la vidéo microscopie $R \sim 5 \cdot 10^{-6} m$ la taille d'une cellule, $\delta t \sim 1 min$ la durée de la traction, et $\eta \cong 10^{-3} Pa.s$ la viscosité de l'eau. Cette estimation sous estime très probablement les forces mises en jeu car on ne raisonne ici que sur des valeurs moyennes sans tenir compte du régime transitoire de mise en route du mouvement. Mais cette force relativement faible est parfaitement compatible avec les mesures faites sur les capacités de traction cellulaire des macrophages (Kress *et al.* 2007).

Cette analyse en temps réel de la phagocytose d'une cellule apoptotique n'a pas permis de mettre en évidence une modulation du processus de captation par la PR3 exprimée à la membrane. Cependant, la phagocytose de cellules apoptotiques exprimant PR3 déclencherait une réponse pro-inflammatoire en comparaison à la phagocytose de cellules apoptotique n'exprimant pas PR3. L'importance de cette modification du programme phénotypique du macrophage et ses conséquences sur le système immunitaire sont l'objet de l'article suivant (article 5).

PARTIE VI : Impact de la PR3 sur le système immunitaire

1. Introduction

Dans l'article précédent nous avons mis en évidence que la PR3 exprimée à la surface d'une cellule apoptotique était susceptible de modifier le phénotype d'un macrophage l'ayant phagocyté. L'étude systématique de cette fonction de la PR3 est l'objet de l'article 5. Nous avons cherché à caractériser les mécanismes et les conséquences de ce changement de programmation du macrophage au cours de l'efferocytose. Une des conséquences de la présence de PR3 est d'induire un microenvironnement pro-inflammatoire produit par les macrophages. Différents types cellulaires sont susceptibles d'être influencés par ce microenvironnement, mais les premières cellules impliquées dans le maintien de la tolérance vis à vis du soi en contexte inflammatoire sont les cellules dendritiques (Cf II.3). Parmi ce groupe de cellules les cellules dendritiques plasmacytoïdes occupent une place particulière.

1.1 Origine et identification des cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont originaires de la moelle osseuse et ne représentent qu'une très faible proportion des cellules circulantes nucléées du sang (0.3-0.5 %). Elles dérivent du progéniteur dendritique commun $CD135^+CD115^+CD117^+$ (ou $FLT3-R^+CSF-1R^+c-kit^+$). La différenciation en pDC repose sur le $Flt3-L$ et le facteur de transcription $E2-2$ qui induit l'expression d'autres facteurs de transcription associés à la différenciation en pDC et inhibe l'expression de $Id-2$ qui est un facteur de transcription impliqué dans la différenciation en cellules dendritiques conventionnelles ou classiques (cDC) (Reizis *et al.* 2011). Une fraction des pDC dérive quant à elle d'une origine lymphoïde (Sathe *et al.* 2013). Ces cellules se différencient par l'expression de marqueurs de surface, qui peuvent différer entre l'humain et la souris. Toutefois l'approche génomique a révélé une grande proximité entre les pDC humaines et murines (Croizat *et al.* 2010). D'un point de vue morphologique les pDC se rapprochent des lymphocytes (d'où leur nom) et expriment des niveaux faibles de

CMH de classe II et de molécules de co-stimulation. L'expression du marqueur CD11c est négative chez l'homme et faible pour la souris. Par contre elles expriment le marqueur B220/CD45RA qui est un marqueur de cellule B. L'identification de ces cellules chez la souris repose sur l'expression forte de PDCA-1 (CD317), Siglec-H, Ly6C et Ly49Q (Reizis *et al.* 2011). Chez l'homme le BDCA-2 (CD303), ILT-7, IL3-R α (CD123) et le BDCA-4 (CD304) sont utilisés (Reizis *et al.* 2011).

1.2 Fonctions immunes des cellules dendritiques plasmacytoïdes

D'un point de vue fonctionnel les pDC expriment les TLR endosomaux TLR-7 et TLR9 et répondent à leurs ligands respectifs que sont l'ARN simple brin et l'ADN contenant des séquences CpG non méthylées. Ce qui caractérise les pDC est la rapidité de réponse à ces stimuli et l'importance de leur capacité de sécrétion d'interféron (IFN) résultante. Les capacités de sécrétion en INF de ces cellules peuvent dépasser d'un facteur 1000 celles d'autres types cellulaires (Siegal *et al.* 1999). La sécrétion d'INF- α *in vivo* repose exclusivement sur ces cellules comme l'ont démontré les études de déplétion par anticorps (Asselin-Paturel *et al.* 2003) ou de souris KO (Cisse *et al.* 2008), ce qui fait de ces cellules un élément clé de la réponse anti-virale. L'activation des pDC induite par les TLR est associée à la sécrétion d'une large gamme de cytokines (TNF- α , IL-12 chez la souris) et chimiokines. La sécrétion de chimiokines par les pDC peut être décomposée en trois vagues suivant la stimulation par des agonistes des TLR : à 2-4 heures sont sécrétées CXCL1, CXCL2 et CXCL4 permettant le recrutement des neutrophiles, les lymphocytes T cytotoxiques et les NK, puis entre 8 et 12 heures sont sécrétées CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11 qui sont impliquées dans le recrutement des monocytes et des lymphocytes T mémoires, enfin entre 12 et 48 heures suivant la stimulation (lorsque les pDC ont normalement atteint les ganglions lymphatiques) sont produites CCL19, CCL22 et CXCL13 qui vont recruter les lymphocytes T naïfs et mémoires, des lymphocytes Th2, des cellules B naïfs et d'autres cellules dendritiques (Piqueras *et al.* 2006). Ces différentes fonctions font des pDC des cellules clés à l'interface entre l'immunité innée et adaptative. Toute aussi importante est la possibilité pour ces cellules de présenter des antigènes endogènes et exogènes et d'utiliser une cross-présentation (Villadangos & Young 2008). Cette capacité est une fonction importante des pDC dans le mécanisme de tolérance centrale. En effet, les pDC immatures sont capables de capter et de transporter des antigènes du soi de la périphérie vers le thymus. Cette

migration est dépendante de l'expression de CCR9 sur ces cellules (Hadeiba *et al.* 2012). De manière très intéressante l'activation par les TLR des pDC diminue l'expression de CCR9 sur ces cellules, interrompant ce mécanisme tolérogène. On peut imaginer que dans un contexte inflammatoire ou auto-immun, une activation mimant un signal TLR sur les pDC pourrait participer à la rupture de tolérance par ce mécanisme.

1.3 Développement des lymphocytes T et cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDC immatures peuvent aussi participer à la tolérance de manière indirecte par leur capacité à stimuler le développement des lymphocytes T régulateurs dits « naturels » $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (nTreg) (Chen *et al.* 2008). Les pDC activées via leurs TLR induisent une autre population de cellules T régulatrices : les Tr1. Ces cellules expriment ICOS et produisent de grandes quantités d'IL-10. De manière intéressante dans un environnement riche en INF- α (produit nous l'avons vu par les pDC) les nTreg deviennent des Tr1. Ce mécanisme est une des explications du déficit en nTreg des maladies auto-immunes associées à une signature INF- α , comme le lupus érythémateux disséminé (Le Buanec *et al.* 2011). Les pDC jouent aussi un rôle important vis-à-vis d'autres populations de cellules T. Elles sont notamment capables d'activer les lymphocytes T $CD8^+$ naïfs et les cytotoxiques mémoires spécifiques d'antigènes viraux lorsqu'elles sont activées par leur TLR (Lui *et al.* 2009). Mais elles sont surtout impliquées dans le développement des différentes populations de T auxiliaires. Activées par CD40L ou l'IL-3 elles favorisent le développement de Th2 alors que la voie d'activation des TLR est associée aux Th1 (Ito *et al.* 2004), quant à l'activation via TLR-7 elle oriente vers la formation de Th17 (Yu *et al.* 2010) ou de Th22 (Duhon *et al.* 2009). De manière plus globale dans le cadre d'une signature INF- α , les pDC favorisent une expansion des T $CD8^+$ cytotoxiques et le développement des Th1 tout en supprimant le développement des Treg, Th2 et Th17.

1.4 Clairance des cellules apoptotiques et cellules dendritiques plasmacytoïdes

La biologie des pDC ne se résume pas à leur capacités de sécrétion d'INF de type I. Nous l'avons vu, en fonction du contexte les pDC peuvent aussi orienter la différenciation des lymphocytes T vers les Th2 ou Th17. Ces cellules sont aussi capables de sécréter de l'IL-6 (Angelot *et al.* 2009). Cette cytokine associée au TGF- β est impliquée dans le développement des Th17 (Betteli *et al.* 2006). De plus, le TGF- β diminue les capacités de sécrétion d'INF- α des pDC (Contractor *et al.* 2007). Or l'environnement produit par la clairance des cellules

apoptotiques contient de grandes quantités de TGF- β qui est un élément clés de la résolution de l'inflammation et de la tolérance par le développement de nTreg (Chen *et al.* 2003). Si les pDC sont elles-mêmes capables de phagocyter des cellules apoptotiques et donc de participer à la tolérance centrale par ce biais, leurs capacités de phagocytose sont toutefois moindres que celles des cDC ou des macrophages (Bastos-Amador *et al.* 2012). Mais les pDC ont été montrées comme jouant un grand rôle dans l'induction de tolérance induite par les cellules apoptotiques et ce, indépendamment de la phagocytose de ces cellules (Bonnefoy et al. 2011a). Le microenvironnement produit par les macrophages au cours de l'efferocytose, dont le TGF- β est un élément central, permettait aux pDC de générer des Treg. Ce contrôle de la génération de Treg par les pDC dans un contexte de clairance des cellules apoptotiques a permis de mettre en évidence que via le TGF- β , et leur propre capacités de sécrétion de l'IL-6, les pDC étaient aussi impliquées dans l'orientation Th17 (Bonnefoy et al. 2011b). Ces éléments font des pDC des cellules immunes à l'intersection entre l'immunité innée et adaptative, véritables chef d'orchestre de la réponse immune au cours de la phase de résolution de l'inflammation. Quel est l'impact du microenvironnement créé par les macrophages ayant phagocyté des cellules apoptotiques exprimant la PR3 est le sujet de l'article 5.

2. Article 5 : La protéinase 3, auto-antigène cible de la granulomatose avec polyangéite, interfère avec la résolution de l'inflammation et amplifie sa propre expression

ARTICLE 5

3. Résultats complémentaires

3.1 Recrutement d'éosinophiles au cours d'une péritonite au thioglycollate

La cavité péritonéale d'une souris est une source facile de cellules dont font partie les macrophages. Une cavité péritonéale naïve ne contient que $1 \text{ à } 2 \cdot 10^6$ cellules dont seulement $\sim 40\%$ de macrophages. De plus la population de macrophage résident est hétérogène car deux populations de macrophages y sont présentes : macrophage $F4/80^{\text{hi}}\text{CMHII}^-$ et $F4/80^{\text{lo}}\text{CMH}^{+/-}$ (Ghosn *et al.* 2010). Pour pallier ces désavantages on utilise des produits chimiques permettant d'induire une péritonite aseptique permettant le recrutement de monocytes qui vont une fois recrutés se différencier en macrophage. Un des produits les plus utilisés est le thioglycollate. La péritonite induite permet à 72 heures de récupérer $\sim 10 \cdot 10^6$ macrophages par cavité péritonéale. Mais une des limites de ce modèle est la grande quantité d'éosinophiles recrutés de manière concomitante avec les macrophages (Misharin *et al.* 2012). Misharin *et coll.* ont rapporté que même si une adhésion était pratiquée *in vitro* durant une période pouvant aller jusqu'à 24h avec lavage par PBS, la présence d'éosinophile faussée toute étude de sécrétion de cytokines par exemple après stimulation par LPS. Les auteurs ne détaillent pas leur procédure de lavage, mais comme ce travail remet en cause les protocoles *in vitro* d'étude de macrophage recrutés après stimulation par thioglycollate nous avons vérifié la présence d'éosinophiles après une étape d'adhésion de 6 heures et lavage par PBS. Nous avons donc comme décrit dans l'article 5 injecté 1 mL de PBS avec thioglycollate 3% et récupéré les cellules de la cavité péritonéale à 72 heures. Un marquage par un anticorps anti-F4/80 (Misharin *et al.* 2012) permet bien d'identifier des éosinophiles ($F4/80^{\text{med}}\text{SSC}^{\text{hi}}$) et des macrophages ($F4/80^{\text{hi}}\text{SSC}^{\text{hi}}$) en proportions comparables (Figure VI.1), résultat compatible avec l'observation au microscope avant lavage qui identifie deux populations bien distinctes avec des macrophages adhérents et des cellules granuleuses de plus petite taille non adhérentes. Après 6 heures d'adhésion sur une plaque de culture, les puits sont lavés de manière extensive par PBS et les cellules adhérentes restantes (macroscopiquement des macrophages) sont analysées en FACS (Figure VI.1). Le lavage, contrairement à ce qui est rapporté par Misharin *et coll.* permet d'éliminer les éosinophiles. Le recrutement des macrophages par mobilisation au thioglycollate permet donc d'obtenir des populations

pures de macrophages ayant des caractéristiques phénotypiques homogènes (marquage CD11c de l'article 5).

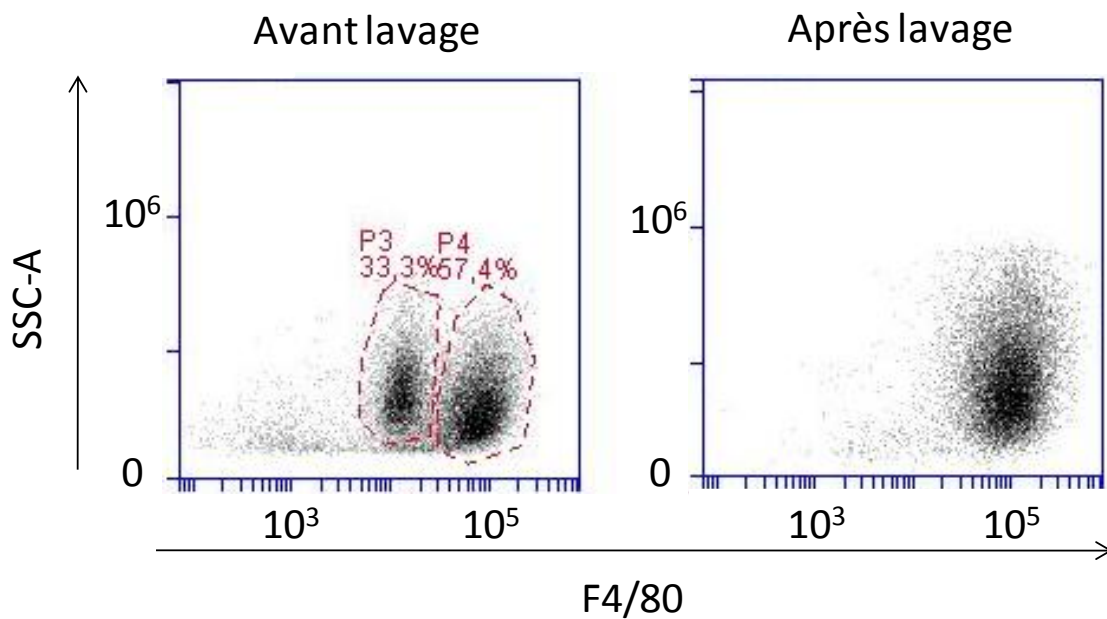


Figure VI.1 : Identification des éosinophiles et des macrophages par leur expression de F4/80 avant et après lavage des cellules consécutivement à une phase d'adhésion de 6 heures. Le lavage permet d'éliminer toute trace significative d'éosinophiles (dot plots représentatifs de plus de 20 expériences indépendantes)

3.2 Etude des facteurs de transcription des lymphocytes T

Dans l'article 5 nous avons déterminé la polarisation des lymphocytes T après 4 jours de co-culture avec les pDC par le marquage intracellulaire de FoxP3 et des cytokines IFN- γ et IL-17. De manière complémentaire nous avons aussi réalisé un marquage sur les mêmes cellules des facteurs de transcription : T-bet pour les Th1 et ROR- γ t pour les Th17 (Figure VI.2). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec les cytokines.

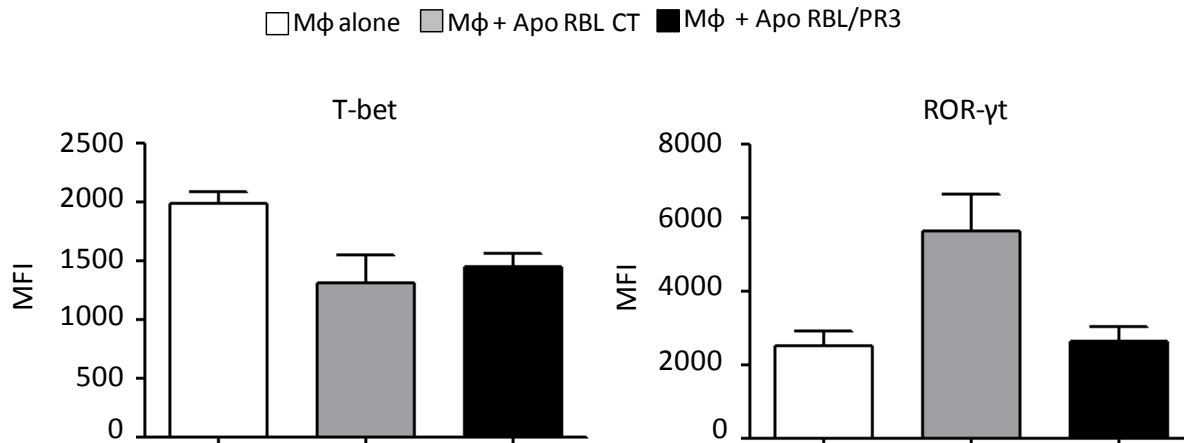


Figure VI.2 : Expression des facteurs de transcription T-bet et ROR-γt sur les lymphocytes T après 4 jours de co-culture avec les pDC initialement exposées au surnageant des macrophages seuls (blanc), ayant phagocytés des RBL CT (gris) ou des RBL PR3 (noir). (n=3)

3.3 Profil de sécrétion des cellules dendritiques plasmacytoïdes exposées au surnageant des macrophages

Dans l'article nous avons rapporté le profil de sécrétion des lymphocytes T en co-culture avec les pDC. Nous avons aussi analysé le profil de sécrétion des pDC après exposition au surnageant des macrophages durant 24 heures de culture en X-vivo-15 (Lonza) après lavage extensif post-exposition aux surnageants. Le surnageant des macrophages ayant phagocyté des cellules apoptotiques exprimant la PR3 était capable d'induire une activation des pDC (sécrétion de cytokines pro-inflammatoires) mais ne modifiait pas l'expression des marqueurs de maturation comme le CD80 ou le CD86 (Figure VI.3 et VI.4).

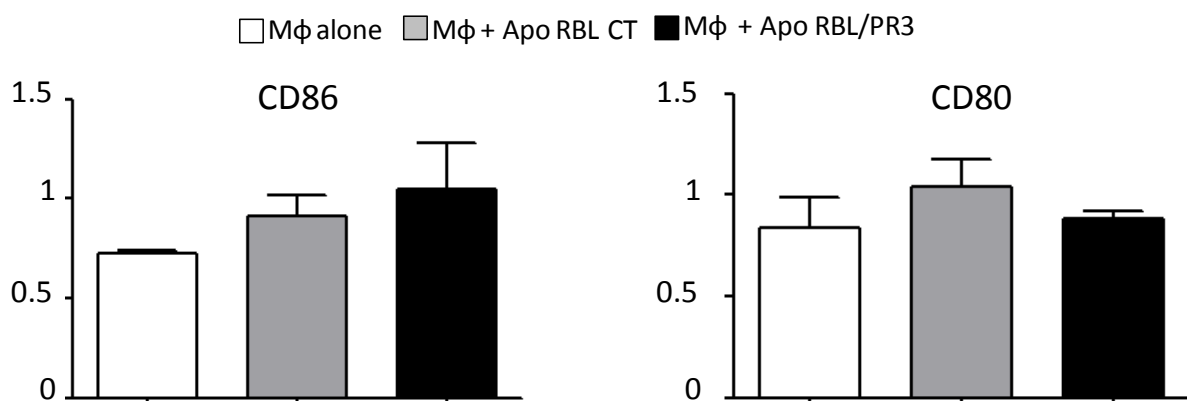


Figure VI.3 : Expression de CD86 et CD80 sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes (ratio des MFI) rapportée à l'expression des cellules cultivées en X-vivo. (n=3)

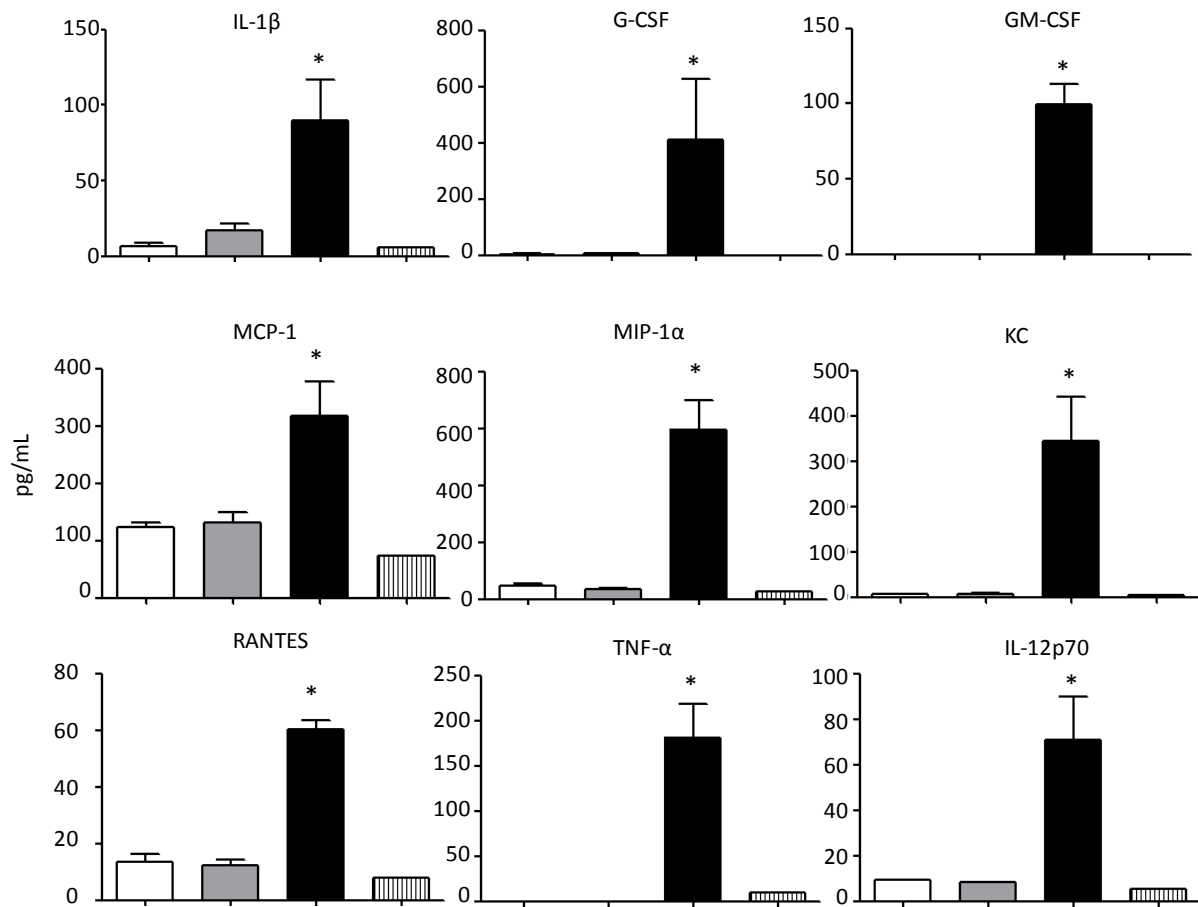


Figure VI.4 : Profil de sécrétion de cytokines, facteurs de croissance et de chimiokines par des cellules dendritiques plasmacytoïdes durant une culture de 24 heures dans du X-vivo consécutive à l'exposition à du surnageant de macrophage (blanc), du surnageant de macrophage ayant phagocyté des RBL CT (gris) ou RBL PR3 (noir), et une culture contrôle dans du X-vivo (rayé vertical). (n=3, *p<0.05 Mann-Whitney).

3.4 Etude des cellules dendritiques « classiques » CD11c⁺

Dans l'article 5 nous avons utilisé un système de co-culture reposant sur les cellules pDC. En effet ces cellules sont susceptibles d'influer sur la polarisation T dans un microenvironnement généré par la clairance des cellules apoptotiques (Bonney *et al.* 2011). Les cellules dendritiques dites « classiques » qui expriment le marqueur CD11c sont elles aussi susceptibles d'être influencées par ce microenvironnement. Nous avons donc utilisé le même protocole que celui décrit dans l'article 5 sur des cellules dendritiques de la rate triées sur l'expression de CD11c. Ces cellules dendritiques étaient comme les pDC activées par le

surnageant des cellules exprimant la PR3. Les marqueurs de maturation CD86 et CD80 sont augmentés et le profil de sécrétion induit prédomine sur les chimiokines (Figure VI.5 et VI.6).

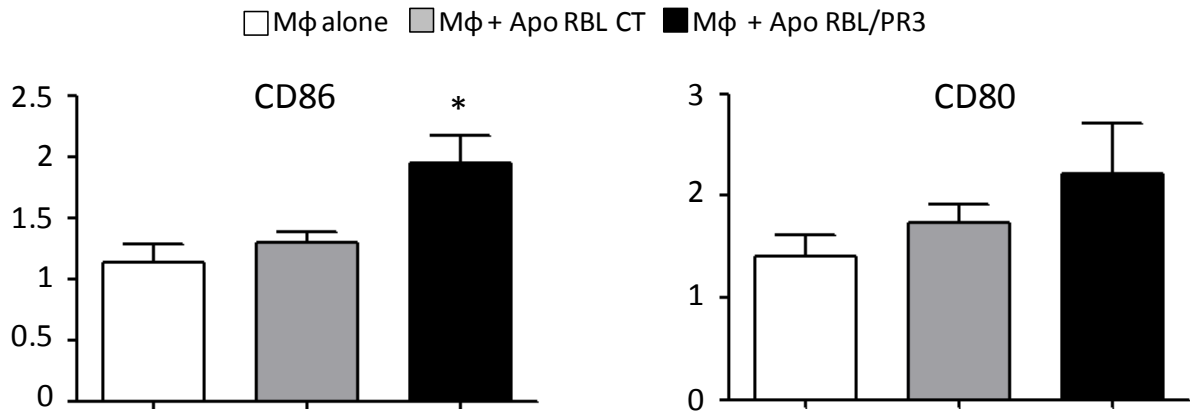


Figure VI.5 : Expression de CD86 et CD80 sur les cellules dendritiques « classiques » CD11c⁺ (ratio des MFI) rapportée à l'expression des cellules cultivées en X-vivo. (n=3, *p<0.05 Mann-Withney)

Toutefois la co-culture effectuée avec les cDC n'a montré aucune modulation entre les cellules apoptotiques exprimant ou non la PR3. D'autre part seule une diminution modérée des lymphocytes T Th1 était observée dans les conditions cellules apoptotiques comparées à la condition surnageant de macrophage seul et nous n'avons pas non plus détecté de T régulateurs ou de Th17.

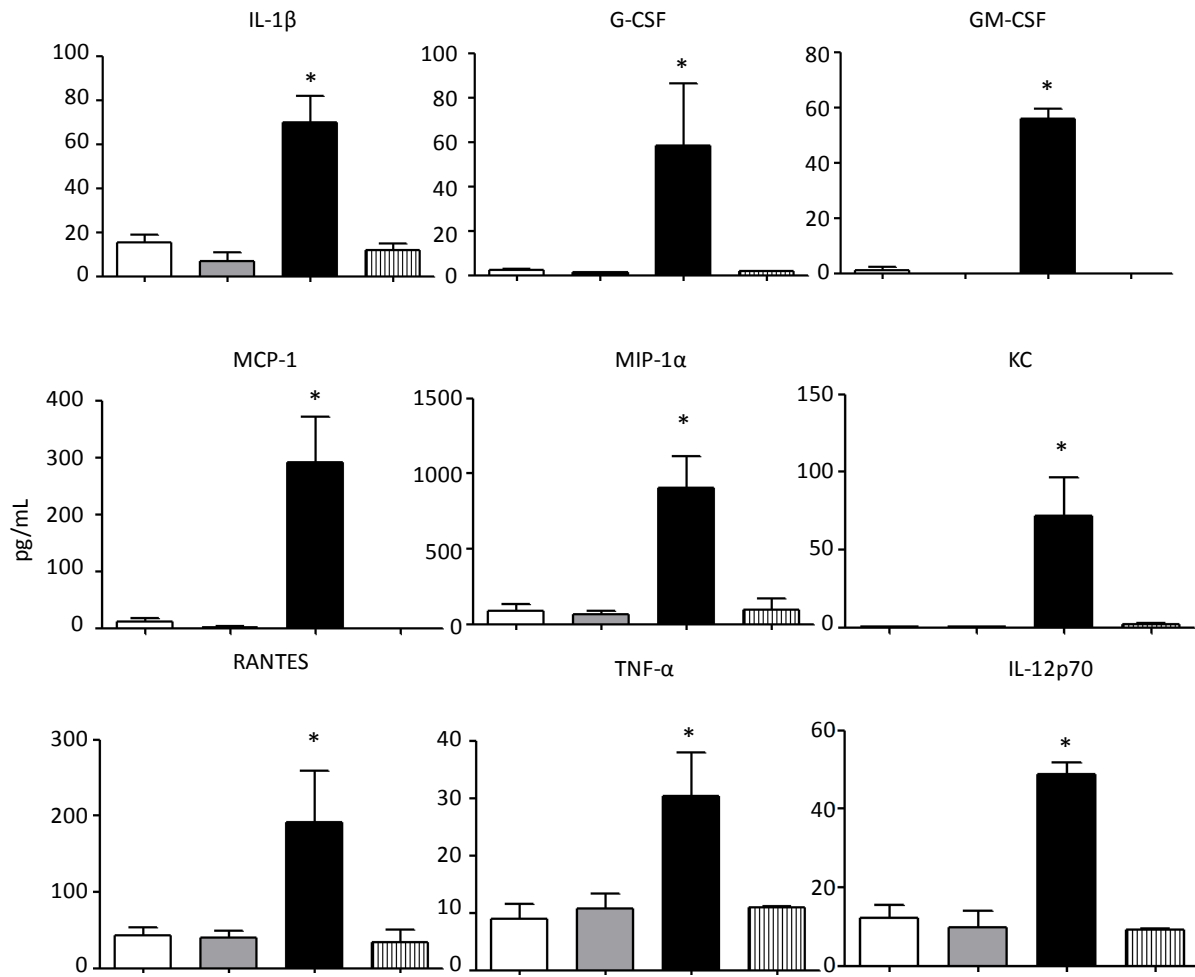


Figure VI.6 : Profil de sécrétion de cytokines, facteurs de croissance et de chimiokines par des cellules dendritiques « classiques » CD11c⁺ durant une culture de 24 heures dans du X-vivo consécutive à l'exposition à du surnageant de culture de macrophage (blanc), du surnageant de macrophage ayant phagocyté des RBL CT (gris) ou RBL PR3 (noir), et une culture contrôle dans du X-vivo (rayé vertical). (n=3, *p<0.05 Mann-Withney).

PARTIE VII : Monocytes/macrophages et PR3

Nous présentons dans cette partie quelques résultats préliminaires ayant trait à l'expression de PR3 dans la lignée monocyte/macrophage. En effet, comme nous l'avons expliqué dans la partie III, seules les cellules myéloïdes comme les neutrophiles et les monocyte/macrophage disposent de l'appareillage enzymatique pour former de la PR3 mature. L'expression de l'auto-antigène de la GPA dans les monocytes/macrophages a reçu une attention bien moindre que celle portée aux neutrophiles.

1. Monocytes

1.1 Différentes populations de monocytes

Les monocytes humains forment un groupe hétérogène de cellules. Depuis la reconnaissance de l'existence de deux sous groupes par Ziegler-Heibroek et coll (Passlick *et al.* 1986), dénommés monocytes classiques et non-classiques, il est actuellement admis qu'au moins trois sous groupes existent. Pour identifier ces sous populations le marquage reposant sur l'expression de CD14 et de CD16 est le plus couramment utilisé. Il permet de distinguer les monocytes classiques CD14^{hi}CD16^{lo}, les monocytes intermédiaires CD14^{hi}CD16^{int} et les monocytes non classiques CD14^{lo}CD16^{hi}. Cette ségrégation phénotypique suggère la possibilité d'une spécialisation de ces différentes sous populations (Wong *et al.* 2012). Les monocytes CD14^{hi}CD16^{lo} qui représentent le pool le plus important (environ 85%) possèdent des capacités de phagocytose supérieures et présente un profil de cytokines spécifique en réponse au LPS comprenant l'IL-10, G-CSF, MCP-1, RANTES, IL-6 et CXCL8. Les monocytes CD14^{hi}CD16^{int} représentent environ 5% des monocytes totaux et sont impliqués en raison de leur forte expression de molécule du CMH de classe II dans la prolifération et la stimulation T. Leur profil de cytokines en réponse au LPS se résume à la sécrétion d'IL-6 et de CXCL-8. Ces monocytes ont une capacité de production de ROS importante et une sous population exprimant Tie-2 est impliquée dans l'angiogénèse. Les monocytes CD14^{lo}CD16^{hi} sont quant à eux une source de TNF- α et d'IL1- β et représentent environ 10% des monocytes. Une partie de cette population exprime le marqueur Slan

(identifié par l'anticorps M-DC8) qui participent à l'activation des populations T et sécrètent aussi de l'IL-12. L'expression de Tie2 et Slan est une autre manière de séparer les sous populations de monocytes non classiques et intermédiaires. La correspondance avec les populations de monocytes chez la souris n'est pas aisée mais les monocytes non classiques humains correspondent à la population $\text{Ly6C}^{\text{lo}}\text{CCR2}^{\text{lo}}\text{CX3CR1}^{\text{hi}}$ impliqués dans le comportement de « patrolling » (Auffray *et al.* 2007), et les classiques aux monocytes inflammatoires murins $\text{Ly6C}^{\text{hi}}\text{CCR2}^{\text{hi}}\text{CX3CR1}^{\text{lo}}$. Cependant cette correspondance n'est pas parfaite comme ne témoigne certaines différences fonctionnelles notamment les monocytes murins Ly6C^{hi} sécrètent de grandes quantités de TNF- α et d'IL-1 β ce qui n'est pas le cas chez l'homme et ne représentent chez la souris que environ 50% de pool de monocytes. La répartition de ces différentes sous populations a été étudiée dans différentes situations pathologiques humaines. Un certain nombre de situations auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde, maladie de Crohn) ou inflammatoire (asthme) ont été associées à l'expansion du compartiment intermédiaire et non classique (Wong *et al.* 2012). Nous avons donc voulu regarder si cela était le cas dans la GPA. Une seule publication avait dans ce contexte posée la question et le résultat était négatif à savoir que les patients atteints de GPA ne présentaient pas de différence de répartition comparés à des sujets sains (Ohlsson *et al.* 2012). Mais les patients inclus dans cette étude étaient en majorité sous traitement et hors poussée de la maladie. Nous avons donc entrepris la caractérisation de ces sous populations chez des patients atteints de formes systémiques de GPA PR3-ANCA positives en poussée (BVAS >3) avant toute introduction de traitement (Figure VII.1). Pour ce faire nous avons utilisé marquer les monocytes directement à partir du prélèvement et nous les avons identifiées sur leur caractéristiques FSC/SSC dans la population CD45^+ (Hrisrtov *et al.* 2012).

Nous n'avons pas constaté de différence dans la répartition des monocytes. De manière fonctionnelle nous avons testé les capacités de production de cytokines (TNF- α et MCP-1) de ces monocytes. Ces résultats, préliminaires car portant sur 2 malades et 2 témoins, ne semblent confirmer que le profil des cytokines est celui des monocytes classiques (figure VII.2) et qu'il n'existe pas de différences entre les patients atteints de GPA et les témoins.

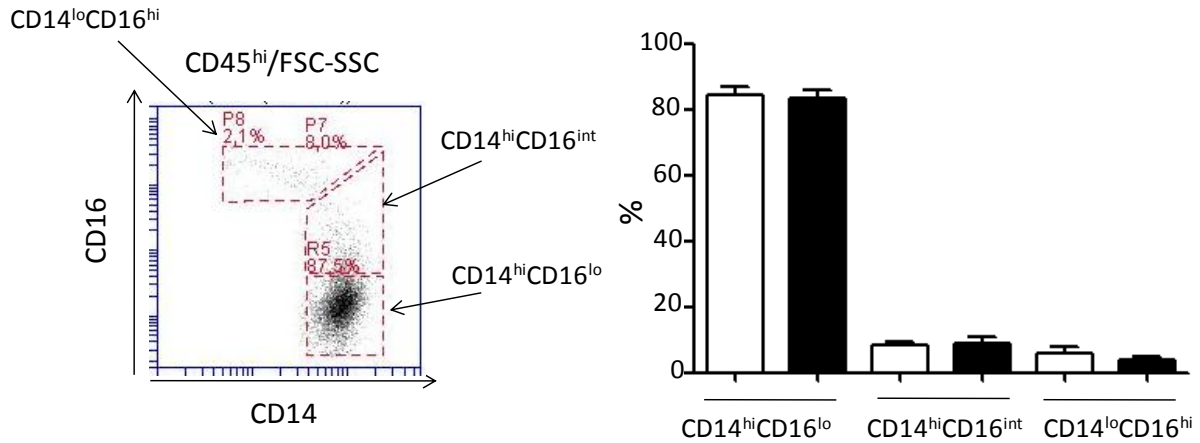


Figure VII.1 : Etude de la répartition des différentes sous populations de monocytes « classiques » CD14^{hi}CD16^{lo}, « intermédiaires » CD14^{hi}CD16^{int} et « non classiques » CD14^{lo}CD16^{hi}. Les fenêtres d'analyse représentées sont représentées (dot plot à gauche). La répartition des différentes populations chez 9 patients atteints de formes systémiques actives de GPA non traitées et de 6 témoins sains est rapportée (histogramme à droite).

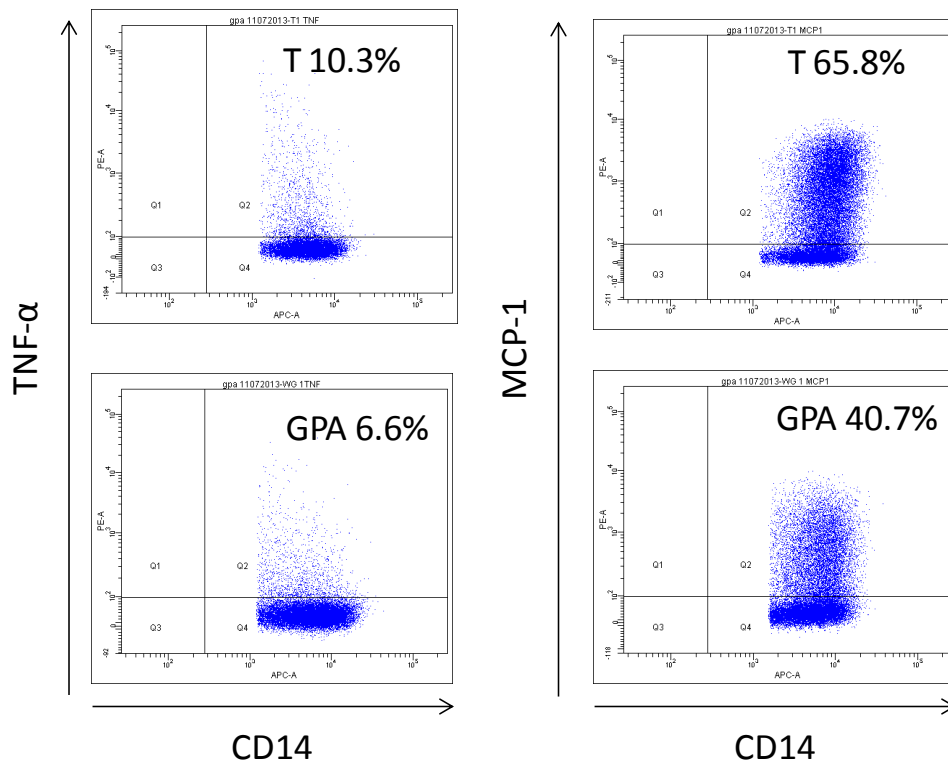


Figure VII.2 : Marquage intracellulaire des cytokines TNF-α et MCP-1 dans les monocytes identifiés par leur marquage CD14, après stimulation par LPS (10ng/mL) durant 16 heures avec blocage de la sécrétion par Brefeldine A à partir de PBMC. Exclusion des cellules mortes par LIVE/DEAD. Le marquage MCP-1 est associé aux cellules CD14^{hi}, le TNF-α provient de cellules ayant un CD14^{int}. Les capacités de production des monocytes ne semblent pas augmentées chez les patients GPA comparées aux témoins (résultats préliminaires, n=2 dans chaque groupe).

1.2 Expression de PR3 et monocytes

Si les différentes sous populations de monocytes ne semblent pas être modifiées au cours de la GPA, nous avons voulu déterminer si ce n'était pas le cas de l'expression de la PR3. En effet, comme nous l'avons vu dans l'article 5 l'expression de la PR3 est dérégulée dans les neutrophiles et ce probablement au cours de leur développement dans la moelle osseuse en raison de l'absence de transcription d'ARN messenger correspondant à la PR3 dans les neutrophiles matures circulants. Mais ce n'est pas le cas des monocytes chez qui l'expression d'ARN messagers de la PR3 a été mise en évidence chez les patients atteints de GPA (Cheadle *et al.* 2010). Plusieurs études se sont intéressées à l'expression de la PR3 dans les monocytes au cours de la GPA, une augmentation de la transcription d'ARNm de la PR3 a été trouvée chez les patients subissant une exacerbation de leur maladie (Ohlsson *et al.* 2005), l'expression membranaire de la PR3 chez ces patients a aussi été rapportée (Muller Kobold *et al.* 1999), alors que certains ne la trouvent exprimée à la membrane qu'après priming par le TNF- α mais permettant l'activation par les ANCA anti-PR3 conduisant à la sécrétion de CXCL8 (Ralston *et al.* 1997). De manière toute à fait intéressante, dans le laboratoire une étude antérieure avait montré que la PR3 était inducible dans les monocytes de manière réversible chez des patients atteints de mucoviscidose subissant une exacerbation infectieuse, alors que ce n'était pas le cas des neutrophiles (Just *et al.* 1999). Nous avons donc étudié l'expression de la PR3 de monocytes issus de patients atteints de GPA en poussée sans traitement (Figure VII.3).

En raison de la rareté du matériel nous n'avons pu étudier de manière systématique l'expression intracellulaire de la PR3, mais nous avons pu montrer comme d'autres équipes que l'expression membranaire de la PR3 semble augmenter dans la GPA, ce qui en fait une cible de choix des ANCA induisant une réponse pro-inflammatoire (Ralston *et al.* 1997). Est-ce que cette expression de la PR3 est associée à une ou des fonctions importantes pour la biologie du monocyte au cours de l'inflammation est une question ouverte.

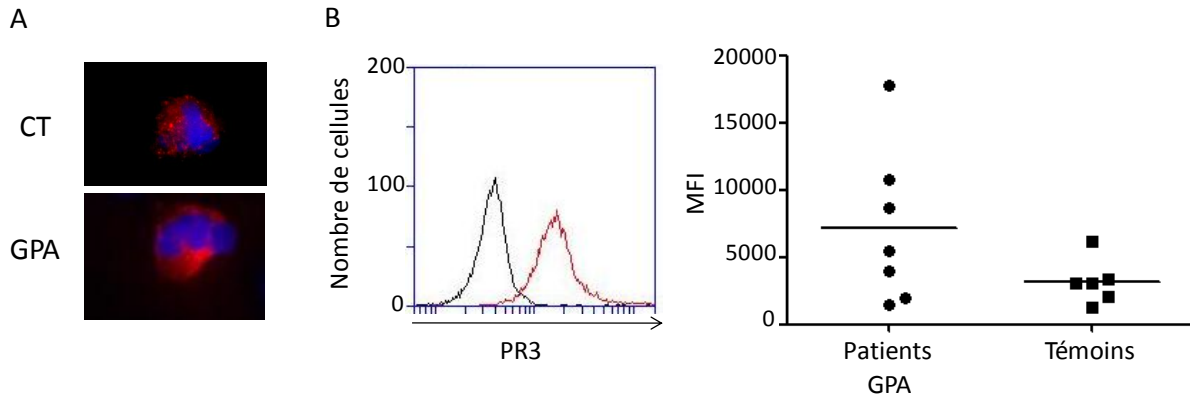


Figure VII.3 : (A) Expression intracellulaire de la PR3 par les monocytes déterminées par immunofluorescence (Microscope Zeiss Axio Observer.Z1 40x, marquage anti-PR3 clone CLB12.8 et coloration Hoescht). (B) Expression membranaire de la PR3 (CLB12.8) par cytométrie en flux. (C) Expression comparée du niveau d'expression membranaire de la PR3 entre des patients GPA et des témoins.

2. Macrophages

2.1 Différenciation des macrophages *in vitro*

L'étude des macrophages *in vitro* se heurte d'emblée à de multiples difficultés. Comme nous l'avons exposé dans la partie II, les macrophages sont hétérogènes. Ils peuvent dériver des monocytes (dans un contexte inflammatoire) ou bien être résident et spécifique de chaque tissu, sans évoquer les travaux récents montrant leur capacité de prolifération. *In vitro* nous sommes chez l'humain, à de rare exceptions près comme les macrophages alvéolaires collectés par lavage broncho-alvéolaire, cantonner à utiliser des macrophages dérivés des monocytes. Se pose alors le type de protocole utilisé pour obtenir des cellules que nous appellerons macrophages. Les trois possibilités actuellement admises dans la littérature reposent sur l'utilisation du sérum autologue, du M-CSF et du GM-CSF. Les différenciations utilisant le GM-CSF donnent des cellules de profil M1-like (ce qui est aussi le cas des protocoles utilisant le M-CSF + IFN- γ , et le LPS) (Geissmann *et al.* 2010). Le M-CSF conduit à des macrophages de type M2a, associé à l'IL-4 des M2b et enfin lorsque l'IL-10 lui est combiné des M2c (Martinez *et al.* 2008). Les marqueurs qui sont les plus communément admis pour caractériser ces macrophages sont l'expression de CD14, CD163 (Scavenger receptor) et le CD206 (Mannose receptor) (Rey-Giraud *et al.* 2012). Nous avons utilisé ces marqueurs pour étudier la différenciation *in vitro* des monocytes par M-CSF et sérum autologue (Figure VII.4).

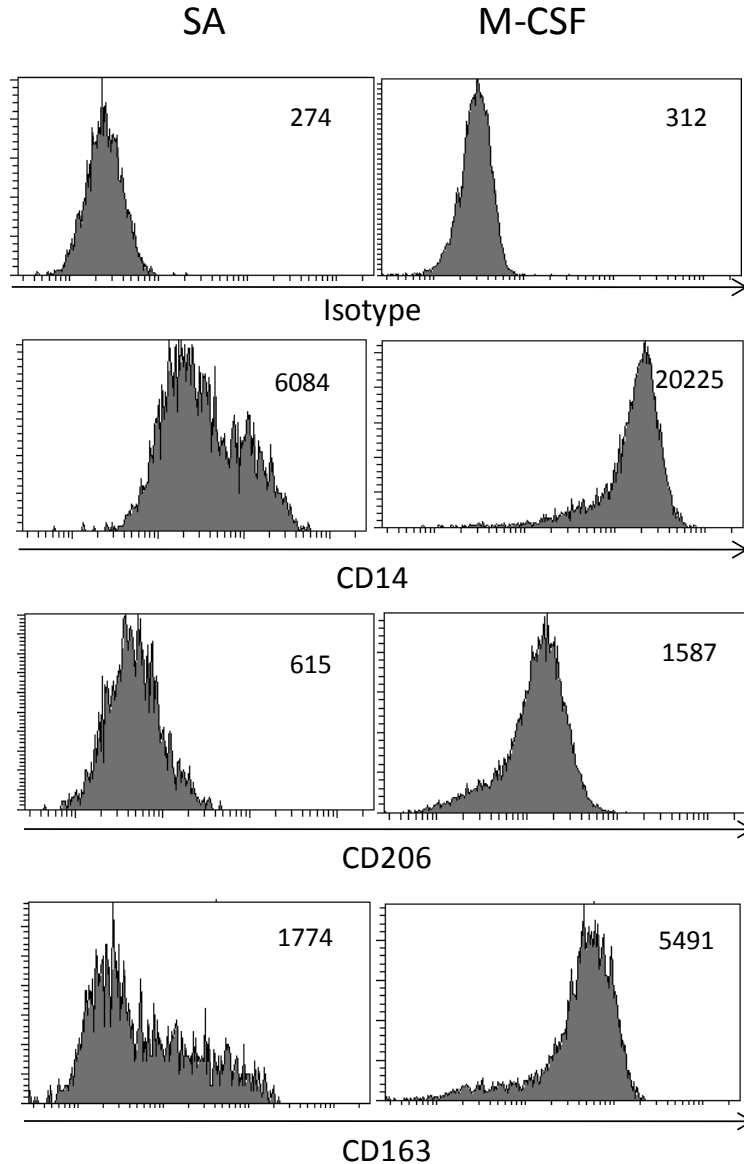


Figure VII.4 : Expression des marqueurs CD14, CD163 et CD206 sur les macrophages différenciés en sérum autologue (10%) ou M-CSF (50ng/mL, Miltenyi biotec) pendant 8 jours à partir de monocytes humains (histogrammes représentatifs de 4 différenciations de donneurs différents, les MFI sont indiquées dans l'encart en haut à droite).

Dans nos mains, l'utilisation de M-CSF permet d'obtenir des macrophages de type M2 et le sérum autologue des macrophages présentant des marqueurs de type M1. Disposant de ces macrophages nous nous sommes intéressés à l'expression de la PR3 dans ces cellules.

2.2 Expression de la PR3 et macrophages

Si les macrophages occupent une place de choix dans ce travail par leur rôle clé dans la clairance des cellules apoptotiques, ces cellules sont aussi susceptibles d'exprimer la PR3.

Cette expression est peut être d'un rôle capital dans la physiopathologie de la GPA. En effet, dans les granulomes une des populations majoritaires est celle des macrophages, or on trouve dans les granulomes une quantité importante de PR3 (Capraru *et al.* 2008). La charge intracellulaire de PR3 est celle des neutrophiles et des macrophages (Braun *et al.* 1991). Cette PR3 n'est, semble-t-il, pas uniquement apportée par les neutrophiles phagocytés par ces macrophages car il a été montré que les macrophages humains alvéolaires expriment à leur surface de la PR3 en l'absence de toute inflammation (Armstrong *et al.* 2006). L'expression intracellulaire de PR3 par les macrophages est d'une importance capitale pour leur phénotype, des travaux effectués dans le laboratoire sur des modèles *in vitro* ont permis de montrer que la PR3 clive p21^{waf1/CIP1} résultant dans la prolifération des cellules promyélocyaires (Witko-Sarsat *et al.* 2002). Mais cet inhibiteur des CDK est aussi un inhibiteur de l'activation des macrophages (Lloberas & Celada 2009), il est donc tentant de se poser la question d'un possible clivage de p21 dans les macrophages ce qui induirait un phénotype pro-inflammatoire propice à la formation de granulome par exemple via la sécrétion de MCP-1 (Jones *et al.* 1992 ; Flory *et al.* 1993), ce qui a été validé dans le laboratoire sur un modèle d'expression de la PR3 dans le macrophage *in vivo* chez le rat (Witko-Sarsat *et al.* 2007). Pour cette raison nous avons étudié l'expression de la PR3 dans les macrophages humains de type M1 ou M2 (Figure VII.5).

Il ressort de ces résultats préliminaires que l'expression de la PR3 est associée à un phénotype M1, donc pro-inflammatoire. Savoir si l'expression de la PR3 est un reflet de ce phénotype ou bien un élément causal via le clivage de p21 est une question ouverte, mais l'inhibition de l'expression de p21 dans des macrophages humains induit une réponse inflammatoire (Scatizzi *et al.* 2009) ce qui rend cette hypothèse séduisante. Dans quelle mesure cette expression est différente dans les macrophages de patients atteints de GPA est aussi à déterminer.

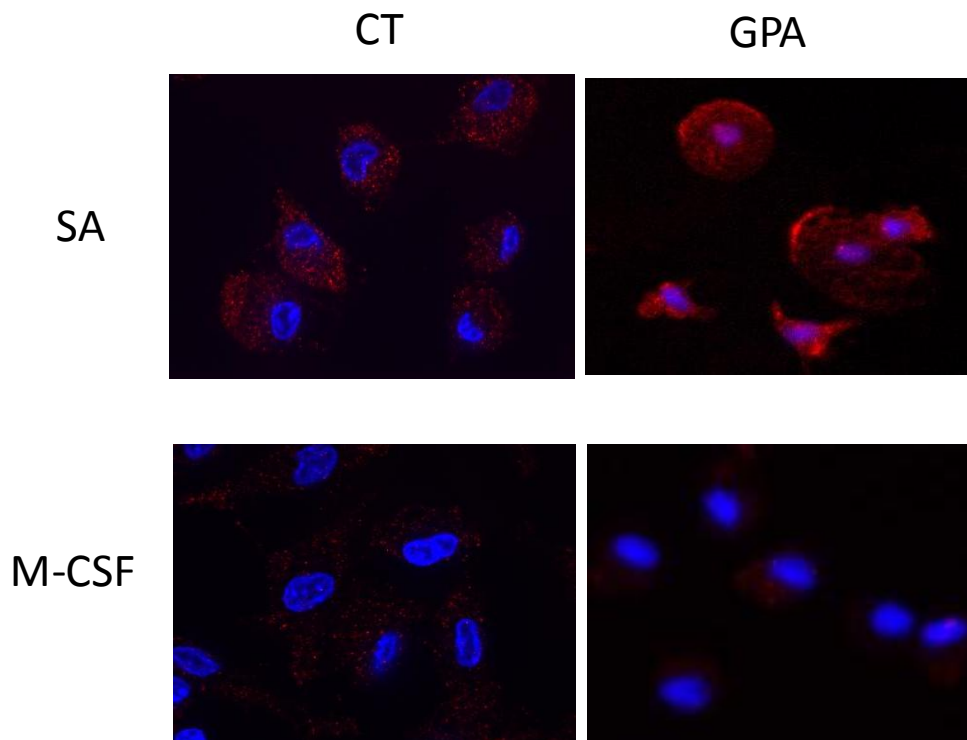


Figure VII.5 : Expression intracellulaire de la PR3 dans des macrophages différenciés en sérum autologue (10%) ou M-CSF (50ng/mL, Miltenyi biotec) pendant 8 jours à partir de monocytes humains. Résultats préliminaires sur deux témoins et un patient atteint de GPA

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

PARTIE VIII : Conclusions & Perspectives

Dans cette partie, nous allons discuter les questions laissées ouvertes ainsi que les perspectives offertes par ce travail.

1. Résultats obtenus

L'étude de la protéinase 3 dans le contexte de la granulomatose avec polyangéite a fait l'objet de nombreux travaux depuis de nombreuses années dans lesquels le laboratoire a apporté une contribution importante. Ces travaux ont permis de mettre à jour un certain nombre de caractéristiques de la PR3 :

- La protéinase 3 est une sérine protéase dont l'activité catalytique lui confère une fonction pro-inflammatoire
- Cette protéase est la cible de l'auto-immunité dans la granulomatose avec polyangéite
- Cette protéase est aussi capable de se lier aux membranes ce qui la distingue de ses homologues
- Cette capacité de lier les membranes est associée à une expression de la protéinase 3 dans des compartiments non classiques pour une protéase des granules
- La protéinase 3 est exprimée de manière constitutive à la membrane de certains neutrophiles

J'ai pu participer au cours de ma thèse aux travaux ayant mis à jour les mécanismes particuliers impliqués dans la liaison à la membrane et son interaction avec certains de ses partenaires :

- La liaison à la membrane de cette protéase dépend de l'existence d'un patch hydrophobe
- Cette protéine est aussi exprimée à la membrane des neutrophiles apoptotiques où elle est inactive catalytiquement

- L'expression de la protéinase 3 au cours de l'apoptose lui permet de s'associer à la calréticuline qui est impliquée dans la reconnaissance des cellules apoptotiques

Ces résultats nous ont permis de formuler l'hypothèse que l'expression membranaire au cours de l'apoptose du neutrophile pouvait interférer avec le rôle immunomodulateur de l'efferocytose. Partant de cette hypothèse ce travail de thèse a permis de mettre en évidence les propriétés suivantes :

- L'expression de la protéinase 3 au cours de l'apoptose est accrue dans la GPA comparée à des sujets sains
- L'expression de la protéinase 3 au cours de l'apoptose interfère avec le processus normal de clairance des cellules apoptotiques
- Les macrophages produisent en conséquence un environnement pro-inflammatoire propice au recrutement d'autres cellules exprimant la protéinase 3 jouant le rôle d'un signal danger
- Cet environnement influence d'autres cellules immunes comme les cellules dendritiques plasmacytoïdes
- Ces cellules induisent alors une distribution de lymphocytes T déséquilibrée vers un profil Th2/Th9 et une diminution de la production de Treg
- Cet environnement s'associe à la production de G-CSF
- Le gène de la protéinase 3 est un gène de réponse au G-CSF, ce qui résulte dans l'auto-amplification de l'expression de la protéinase 3 dans les neutrophiles dans le contexte inflammatoire de la granulomatose avec polyangéite

Ces propriétés permettent de suggérer que la PR3 joue un rôle central dans l'absence de résolution de l'inflammation au cours de la granulomatose avec polyangéite (Figure VIII.1). Mais cette protéine est aussi la cible de l'auto-immunité dans cette maladie. Il est tentant d'imaginer que cette capacité pour la PR3 de maintenir une inflammation chronique associée à la formation de granulomes favorise la rupture de tolérance vis-à-vis de cet auto-antigène. Pour modérer ces propos nous voudrions maintenant discuter le fait qu'une grande partie du travail précédent a été obtenu *in vitro* et sur des modèles murins.

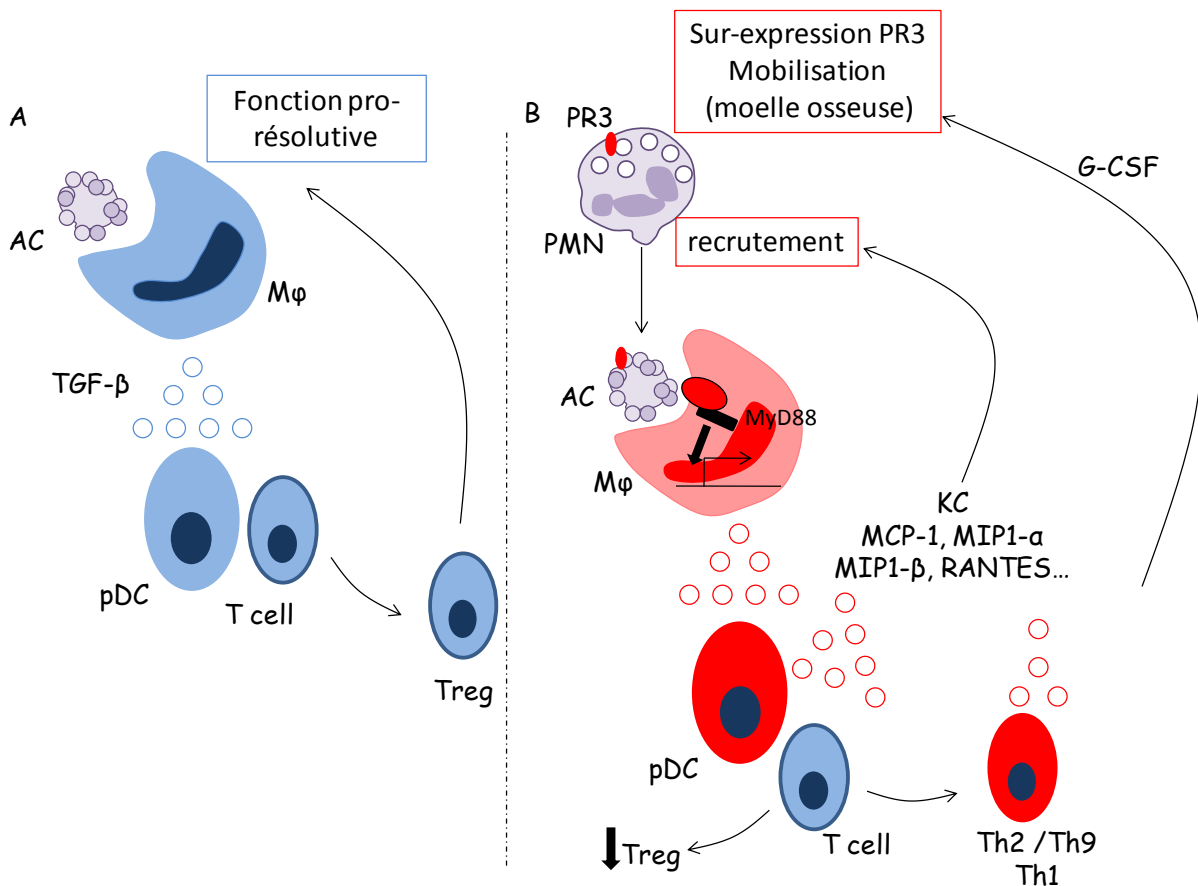


Figure VIII.1 : Schéma récapitulatif de la perturbation induite par l'expression de la PR3 à la membrane des neutrophiles apoptotiques sur le phénomène immunomodulateur des cellules apoptotiques (A). En effet, la PR3 modifie le microenvironnement produit par les macrophages, mimant un signal danger, résultant dans l'orientation de la polarisation T vers un profil Th2/Th9, le recrutement d'autres neutrophiles et la sur-expression de la PR3 dans ces neutrophiles par un mécanisme dépendant du G-CSF (B).

2. Extension à un modèle *in vivo*

La possibilité pour la PR3 d'induire la production par les macrophages d'un microenvironnement influençant la polarisation des lymphocytes T par les cellules dendritiques plasmacytoïdes, a été démontrée *in vitro*. Il semble nécessaire de valider ces résultats dans un modèle *in vivo*. Pour ce faire, et tenant compte du fait que la PR3 murine n'est pas représentative de la biologie de la PR3 humaine, il faut développer un système murin exprimant la PR3 humaine. Deux possibilités s'offrent à nous, le développement d'une souris transgénique (projet en cours de développement dans le laboratoire) ou un modèle de transfert de moelle avec infection lentivirale préalable pour reconstitution d'une moelle exprimant la PR3 humaine. L'existence d'un tel modèle *in vivo* permettrait d'étudier l'impact de la PR3 sur un processus d'inflammation aiguë, comme une péritonite induite au thioglycollate ou sur un processus plus chronique (modèle d'arthrite au collagène par

exemple). L'évaluation du rôle de la PR3 dans une inflammation aiguë comprendra l'étude du rôle de la PR3 exprimée à la membrane de neutrophiles murins apoptotiques et le rôle de l'expression de la PR3 dans les macrophages. L'injection de neutrophiles apoptotiques exprimant la PR3 à différents temps d'une péritonite induite par thioglycollate sur des souris sauvages permettrait de valider les résultats obtenus avec les RBL (Figure 1 article 5), mais aussi d'étudier la transition CD11b^{hi} vers CD11b^{lo} associée à la phagocytose de nombreuses cellules apoptotiques par les macrophages (Schif-Zuck *et al.* 2011). Cette transition n'est pas observée avec les RBL en raison d'un index de phagocytose trop faible (Figure VIII.2), or il s'agit d'un marqueur très intéressant du changement de programme qu'un macrophage entreprend durant l'efferocytose.

L'autre possibilité est d'utiliser les souris exprimant la PR3 humaines et d'étudier la cinétique de résolution de l'inflammation induite par le thioglycollate. La détermination de la balance entre l'apoptose des macrophages et leur migration serait particulièrement intéressante (Gautier *et al.* 2013) ainsi que l'étude à nouveau de la transition CD11b dans le contexte inflammatoire où la PR3 est exprimée par les deux espèces phagocytaires majoritaires. L'étude de modèles d'inflammation plus chronique est aussi nécessaire. L'arthrite à collagène ou l'encéphalite auto-immune expérimentale sont des modèles inflammatoires sensibles à l'effet immunomodulateur des cellules apoptotiques (Miles *et al.* 2012). Ces modèles permettraient d'étudier le rôle de la PR3 sur des neutrophiles apoptotiques injectés à ces souris. Le rôle de l'expression de la PR3 dans les macrophages pourrait aussi être étudié dans ces modèles. L'implication du microenvironnement produit par les macrophages pouvant être étudiée par l'injection de liposomes de clodronate (permettant la déplétion des macrophages) ou encore le rôle des pDC pourrait être validé par déplétion à l'aide d'anticorps.

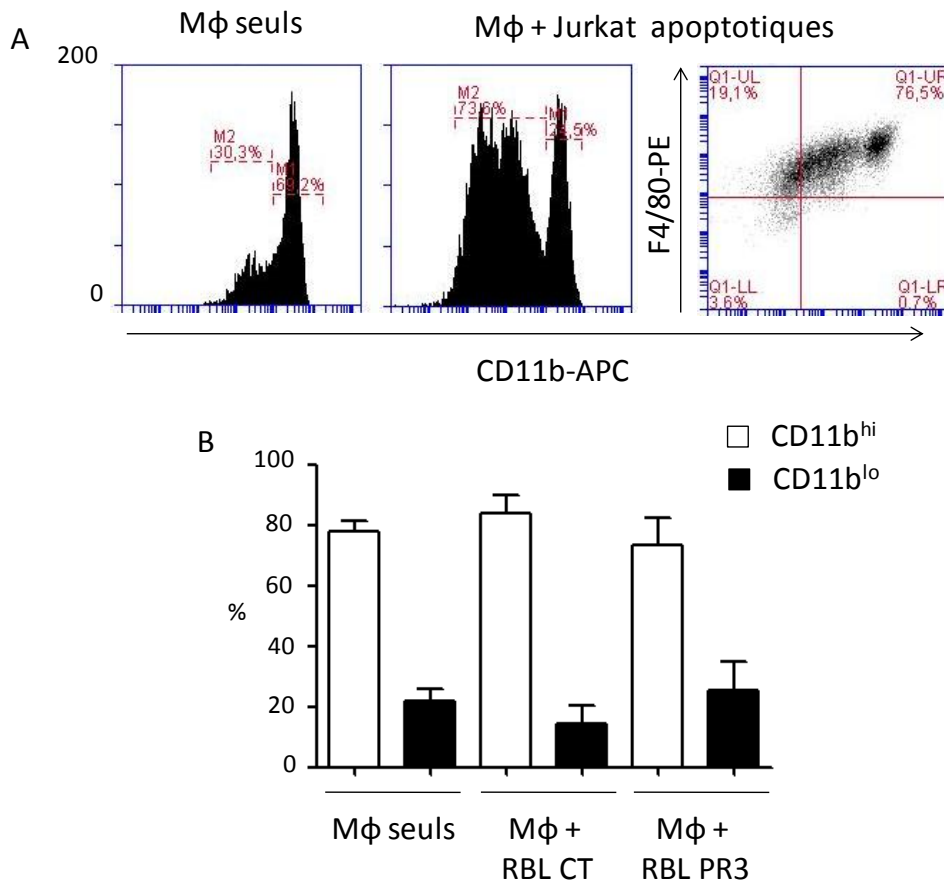


Figure VIII.2 : (A) Illustration de la transition CD11b^{hi} vers CD11b^{lo} lors de la phagocytose de cellules apoptotiques, ici des Jurkat mis en contact pendant 24 heures. (B) Expérience similaire avec des RBL, histogramme représentant la proportion de macrophages CD11b^{hi} et CD11b^{lo}. Aucune transition n'est constatée (n=3).

Un autre mécanisme d'induction de tolérance induit par les cellules apoptotiques est médié par l'expression d'ADN à leur surface ce qui induit la sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes B via une stimulation du TLR9 (Miles *et al.* 2012). La protéinase 3 étant cationique, une interaction avec l'ADN présent à la surface des cellules apoptotiques est par principe intéressante à étudier. Une autre question que le modèle murin nous permet d'aborder : est-ce que l'injection à répétition de cellules apoptotiques exprimant la PR3 induit la production d'anticorps dirigés contre cet antigène ?

Si nous avons concentré notre attention sur l'expression de la PR3 à la surface des neutrophiles, il n'en reste pas moins que l'expression de la PR3 dans les macrophages reste un champ d'investigation majeur (comme suggéré dans la partie VII). Le modèle murin

d'expression de la PR3 humaine pourrait permettre d'étudier le rôle de la PR3 dans le phénotype d'un macrophage (évalué par stimulation LPS, autres agonistes des TLR), ses capacités de phagocytose (billes latex fonctionnalisées, cellules apoptotiques ou bactéries), ses capacités de migrations vers les ganglions ou encore la transition CD11b.

3. Macrophages et protéinase 3

Les macrophages jouent un rôle fondamental dans la clairance des cellules apoptotiques, comme nous l'avons vu, et la PR3 est capable d'influencer leur comportement par ce biais. Mais la PR3 peut jouer un rôle dans la biologie du macrophage par d'autres voies, que ce soit par l'expression de cette protéine directement par le macrophage ou bien par apport extracellulaire sans support cellulaire comme dans le cas des cellules apoptotiques (Figure VIII.2)

L'importance fonctionnelle de l'expression de la PR3 par les macrophages qui dépend de leur état d'activation (Figure VII.5) est une question fondamentale. A commencer par le rôle de la PR3 dans la différenciation du macrophage lui-même exposé à un environnement cytokinique particulier. En effet nous savons que la PR3 est impliquée dans la différenciation myéloïde (Dublet et al. 2002). Une façon d'étudier le rôle de la PR3 serait d'utiliser un vecteur lentiviral ou une transfection permettant la surexpression au niveau monocytaire humain et de déterminer le phénotype résultant de la différenciation. Les conséquences fonctionnelles de cette surexpression au cours de la différenciation ou bien lorsque les cellules sont déjà différenciées en macrophages doivent être évaluées (profil cytokinique, capacité de phagocytose, modèle *in vitro* de granulome).

Comme suggéré par le schéma précédent la PR3 peut provenir du milieu extracellulaire, en effet nous avons mis en évidence que la PR3 exogène peut se fixer à la surface d'un macrophage (Figure VIII.3 A). Il est intéressant de noter que cette fixation s'associe à l'expression de PtdSer par les macrophages en dehors de tout processus apoptotique. Ce résultat rejoint les résultats de modélisation de dynamique moléculaire présentés dans l'article 3, qui montre la capacité de la PR3 à lier les membranes. Des résultats non publiés du laboratoire tendent à montrer que cette capacité est particulièrement nette avec une membrane formée de PtdSer.

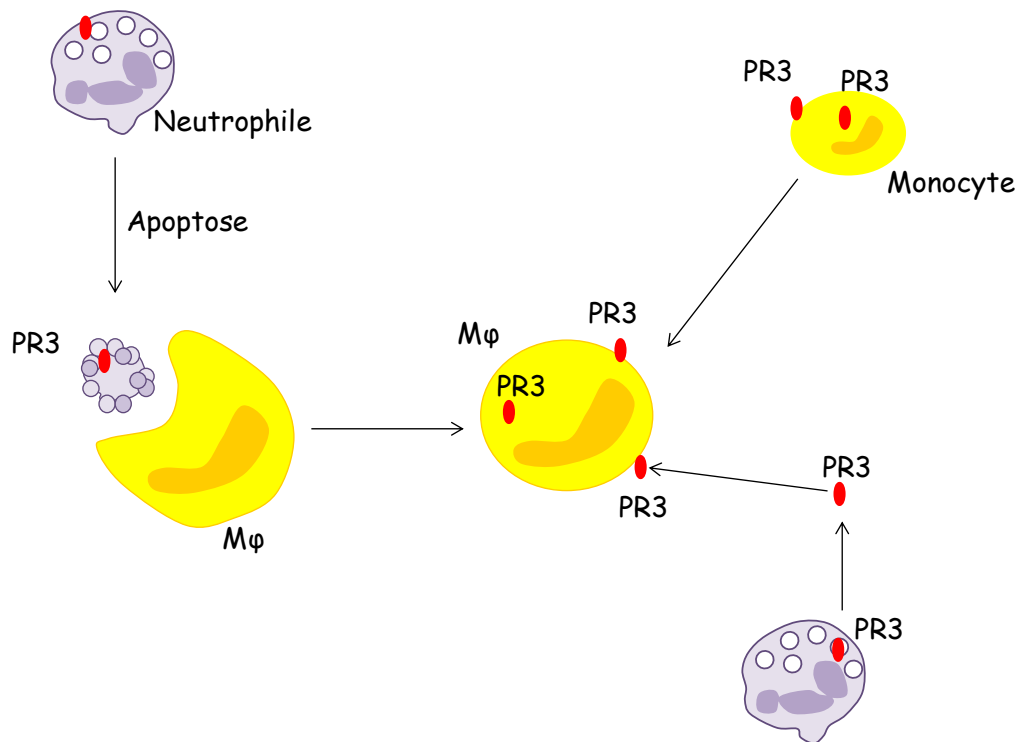


Figure VIII.3 : Schéma représentant les différentes possibilités pour la protéinase 3 d'influencer la biologie du macrophage. La protéinase 3 peut provenir des cellules apoptotiques, être présente dans le macrophage en raison de son expression dans un monocyte ou bien dans un macrophage résident et enfin elle peut provenir du milieu extracellulaire (sécrétée par exemple).

De manière démonstrative mais préliminaire, j'ai pu montrer que le surnageant (dépourvu de cellules) produit par des cellules apoptotiques exprimant la PR3 est capable d'induire l'activation des macrophages de manière similaires aux cellules elles-mêmes (Figure VIII.3 B). Ce résultat pose la question de la nécessité de la phagocytose pour l'activation des macrophages par la PR3 sans remettre en question le fait que les cellules soient phagocytées et que la PR3 peut agir aux deux niveaux. L'étude du « reprogramming » des macrophages secondaire à l'exposition au surnageant seul nécessite d'être fait. Mais ce résultat ouvre une autre piste à savoir que la capacité de fixation sur des membranes exprimant des PtdSer dans un contexte inflammatoire et en présence de cellules activées et d'autres apoptotiques nous amène à soulever la question d'un transport possible de la PR3 par les microparticules. En effet dans l'expérience précédente aucune centrifugation n'avait été réalisée pour

éliminer les microparticules. Cette information serait d'une importance capitale, étant donné le rôle joué par les microparticules comme médiateurs inflammatoires (Pisetsky *et al.* 2012).

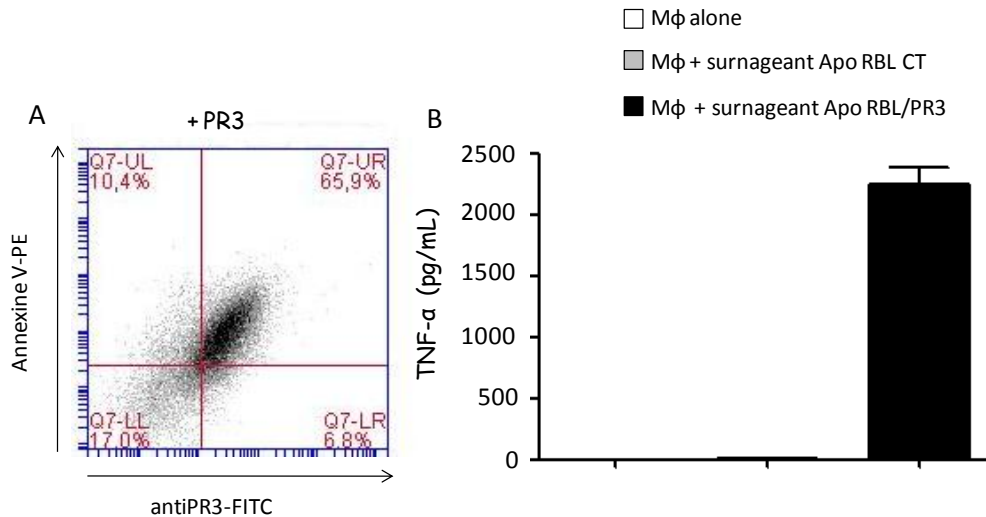


Figure VIII.4 : (A) Expression de la PR3 exogène (humaine purifiée) à la membrane d'un macrophage murin exprimant de la PtdSer indépendamment de toute apoptose. (B) sécrétion de TNF- α induite par le surnageant de cellules apoptotiques (sans cellules) mis en contact avec des macrophages murins pendant 24 heures (n=5).

4. Questions soulevées par la phagocytose des cellules apoptotiques

De l'étude de la clairance de neutrophiles apoptotiques exprimant la PR3, une question naïve apparaît. Si les neutrophiles dont une proportion importante expriment de la PR3 lorsqu'ils sont apoptotiques induit une inflammation médiée par les macrophages, pourquoi ne sommes nous pas le siège d'une inflammation permanente étant donné qu'approximativement 10^{11} neutrophiles sont phagocytés chaque jour. Il existe plusieurs réponses à cette question. La première consiste à identifier la clairance journalière des neutrophiles comme ne dépendant pas de leur apoptose mais d'un phénomène appelé phagoptose, à savoir leur mort par phagocytose et non leur phagocytose consécutive à leur mort. Ce phénomène fascinant est très difficile à évaluer *in vivo* mais la constatation que des souris déficiente pour des éléments clés de l'apoptose (comme Bcl-2) se développent quasi normalement illustre l'importance sous estimée de ce mécanisme d'élimination cellulaire (Brown & Neher 2012). Ce phénomène suggère l'intérêt d'étudier la sénescence des

neutrophiles et l'expression de la PR3 à leur surface. Les conséquences de la phagocytose d'un neutrophile sénéscent sur le phénotype du macrophage ne sont pas connues, mais on serait alors tenté de lui accorder un rôle immunomodulateur dans un contexte non inflammatoire. Le deuxième type de réponse consiste à reconnaître que l'élimination des neutrophiles en situation physiologique se déroule dans des tissus induisant un phénotype particulier ne permettant pas l'activation des macrophages par la PR3. Une manière d'approcher cette idée expérimentalement serait de générer *in vitro* plusieurs phénotypes (M1, M2a, M2b, M2c) et de tester leur capacité à être stimulé par la PR3. Cette expérimentation pourrait être couplée à l'étude de l'influence de facteurs exogènes comme les glucocorticoïdes par exemple. L'impact de la PR3 que nous avons décrit sur les macrophages pose la question d'une éventuelle fonction bénéfique en dehors de tout contexte pathologique comme la granulomatose avec polyangéite. Ce maintien du macrophage dans un phénotype inflammatoire pourrait avoir un intérêt certain dans un contexte infectieux. L'efficacité de la clairance des neutrophiles apoptotiques soulève à son tour deux questions : La première porte sur la sélectivité de la phagocytose dans un contexte infectieux ou dit autrement comment un macrophage choisit entre une cellule apoptotique et une bactérie, s'il choisit ? La deuxième porte sur le sens habituel attribué à la clairance rapide des neutrophiles apoptotiques, à savoir est-ce vraiment pour éviter la libération du contenu du neutrophile que ces cellules sont phagocytées ? La première question est celle de la priorisation des signaux reçus par le macrophage que ce soit la détection de molécules solubles, ancrées dans la matrice extracellulaire (haptotaxie) ou encore par contact. Sur un site inflammatoire le macrophage est susceptible d'être confronté à des bactéries et à des cellules apoptotiques, étant donné que la clairance engage un changement de programme vers un profil anti-inflammatoire la reconnaissance de la cible prioritaire doit être régulée. L'expérience simple d'un mélange des deux cibles ne permettrait probablement pas de répondre à la question, la distance aux cibles n'étant pas contrôlée mais donnerait une évaluation statistique. La meilleure manière de répondre à cette question de priorisation est d'utiliser un système microfluidique qui permet l'apport contrôlé d'une cellule à un endroit donné en l'occurrence là où un macrophage aurait au préalable été mis en place. Les systèmes microfluidiques offrent la possibilité de construire des circuits qui permettrait de mettre deux signaux en compétition, que ce soit des cellules ou bactéries mais aussi de chimioattractant ou des « find-me ». Le choix du macrophage en fonction de son état propre

(différenciation, activation préalable, traitement pharmacologique) pourrait ainsi être déterminé. La question de la priorisation rejoint celle qui consiste à décrire la clairance des neutrophiles apoptotiques comme étant un enjeu majeur pour le système immunitaire en raison du risque que comporterait la libération du contenu des neutrophiles lors d'une nécrose secondaire à l'apoptose. Cette vision a été contestée dans un travail récent. En effet, dans ce travail les auteurs ont pu montrer que les neutrophiles nécrotiques n'induisaient pas de réponse pro-inflammatoire au contraire se révélaient anti-inflammatoires (Miles et al. 2009). Cet effet anti-inflammatoire était lié à la libération d' α -défensines. De manière très intéressante, les autres types cellulaires nécrotiques testés étaient quand à eux associés à une réponse pro-inflammatoire. Cet effet des α -défensines était aussi observé lors d'une stimulation des macrophages par des bactéries entières. Les neutrophiles humains nécrotiques ont pu aussi être utilisés dans un modèle de péritonite chez la souris et ont permis de diminuer le recrutement de neutrophiles murins. Comme le note les auteurs l'absence d' α -défensines dans les neutrophiles de souris est une différence notable dont il faut tenir compte dans l'exploration du rôle inflammatoire de la clairance des neutrophiles sur un site inflammatoire. Il serait très intéressant de regarder la libération d' α -défensines chez des neutrophiles de patients atteints de GPA. Il serait aussi fondamental de valider l'activation des macrophages par des neutrophiles apoptotiques de patients, car dans notre modèle ou un modèle murin cette particularité du neutrophile n'est pas prise en compte. Ces résultats permettent aussi de proposer un rôle un peu différent de la mort du neutrophile (en tout cas chez l'homme), nous proposons l'hypothèse suivante :

Hypothèse : *l'apoptose des neutrophiles est en elle-même un senseur intégratif de l'état du site inflammatoire. La clairance par les macrophages est un processus de signalisation dont le médiateur est de niveau cellulaire et permet d'induire la phase de résolution via un changement de phénotype du macrophage. Ce processus n'est pas nécessairement un impératif en vue d'éviter une aggravation de l'inflammation par l'évolution des neutrophiles vers la nécrose.*

Modifier l'apoptose des neutrophiles serait donc un moyen de modifier le « thermostat » cellulaire local de l'inflammation. Et la PR3 pourrait jouer un rôle dans la sensibilité de ce « thermostat ».

5. Approches thérapeutiques

Ce travail s'inscrivant dans le contexte pathologique de la granulomatose avec polyangéite, il est nécessaire de réfléchir aux conséquences thérapeutiques qui pourraient être explorées. L'expression de la PR3 étant augmentée au cours de cette maladie, il est tentant de cibler cette expression. Des travaux antérieurs avaient montré que l'acide tout-trans rétinoïque était capable d'inhiber la transcription du gène de la PR3 dans le contexte des leucémies aigües pro-myélocyaires (Labbaye *et al.* 1993 ; Lutz *et al.* 2001). Cette molécule apparaît donc comme un outil possible, il en est de même pour les stratégies ciblant le G-CSF (Cornish *et al.* 2009). Une autre piste serait de contrer les effets délétères de la PR3 directement en lien avec son activité catalytique. L'idée serait de proposer en traitement d'attaque un apport d' α 1-antitrypsine même en l'absence de déficit quantitatif mais dans l'optique que les capacités d'inhibition sont dépassées par la quantité de PR3 chez ces patients, cette approche a été montrée efficace chez des patients atteints d'un déficit génétique (Hernández Pérez *et al.* 2013). Même si nous avons montré (article 3) que l'inhibition de la PR3 membranaire par l' α 1-antitrypsine est moindre que pour la forme soluble il s'agit aussi d'une façon de masquer la PR3 et donc d'agir sur des fonctions non nécessairement médiées par l'activité catalytique comme lors de l'efferocytose. De manière plus ambitieuse, on pourrait essayer de modifier l'effet de la PR3 sur le reprogramming des macrophages. La première façon serait d'injecter des cellules apoptotiques ne l'exprimant pas pour saturer les macrophages. L'utilisation de perfusion de cellules apoptotiques comme moyen thérapeutique est une voie thérapeutique déjà en cours d'exploration pour de nombreuses maladies auto-immunes et/ou inflammatoire (Saas *et al.* 2013). L'autre voie serait de reprogrammer les macrophages *in vitro* de type pro-résolutif et de les ré-injectés comme cela a été montré chez la souris avec une efficacité réelle dans un modèle d'inflammation chronique rénale (Wang *et al.* 2007). La possibilité de modifier le phénotype des macrophages *in situ* a été validé dans un modèle murin de glioblastome. En bloquant le récepteur du M-CSF il a été possible d'inhiber l'expression de marqueurs M2 et la croissance tumorale associée à ce phénotype (Pyonteck *et al.* 2013). Savoir si il serait possible de développer une réponse de type M2 par des agonistes du M-CSF-R dans un contexte inflammatoire n'est pas connu.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abbink, J. J., A. M. Kamp, J. H. Nuijens, T. J. Swaak, and C. E. Hack. 1993. Proteolytic inactivation of alpha 1-antitrypsin and alpha 1-antichymotrypsin by neutrophils in arthritic joints. *Arthritis Rheum* 36:168-180.
2. Abdgawad, M., L. Gunnarsson, A. A. Bengtsson, P. Geborek, L. Nilsson, M. Segelmark, and T. Hellmark. 2010. Elevated neutrophil membrane expression of proteinase 3 is dependent upon CD177 expression. *Clin Exp Immunol* 161:89-97.
3. A-Gonzalez, N., S. J. Bensinger, C. Hong, S. Beceiro, M. N. Bradley, N. Zelcer, J. Deniz, C. Ramirez, M. Diaz, G. Gallardo, C. R. de Galarreta, J. Salazar, F. Lopez, P. Edwards, J. Parks, M. Andujar, P. Tontonoz, and A. Castrillo. 2009. Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. *Immunity* 31:245-258.
4. Anderson, H. A., C. A. Maylock, J. A. Williams, C. P. Paweletz, H. Shu, and E. Shacter. 2003. Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Immunol* 4:87-91.
5. Angelot, F., E. Seilles, S. Biichle, Y. Berda, B. Gaugler, J. Plumas, L. Chaperot, F. Dignat-George, P. Tiberghien, P. Saas, and F. Garnache-Ottou. 2009. Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: potential implications in inflammatory diseases. *Haematologica* 94:1502-1512.
6. Ariel, A., G. Fredman, Y. P. Sun, A. Kantarci, T. E. Van Dyke, A. D. Luster, and C. N. Serhan. 2006. Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nat Immunol* 7:1209-1216.
7. Arita, M., T. Ohira, Y. P. Sun, S. Elangovan, N. Chiang, and C. N. Serhan. 2007. Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *J Immunol* 178:3912-3917.
8. Armstrong, L., S. I. Godinho, K. M. Uppington, H. A. Whittington, and A. B. Millar. 2006. Contribution of TNF-alpha converting enzyme and proteinase-3 to TNF-alpha processing in human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34:219-225.
9. Arur, S., U. E. Uche, K. Rezaul, M. Fong, V. Scranton, A. E. Cowan, W. Mohler, and D. K. Han. 2003. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell* 4:587-598.
10. Asselin-Paturel, C., G. Brizard, J. J. Pin, F. Briere, and G. Trinchieri. 2003. Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J Immunol* 171:6466-6477.
11. Atabai, K., S. Jame, N. Azhar, A. Kuo, M. Lam, W. McKleroy, G. Dehart, S. Rahman, D. D. Xia, A. C. Melton, P. Wolters, C. L. Emson, S. M. Turner, Z. Werb, and D. Sheppard. 2009. Mfge8 diminishes the severity of tissue fibrosis in mice by binding and targeting collagen for uptake by macrophages. *J Clin Invest* 119:3713-3722.
12. Athens, J. W., O. P. Haab, S. O. Raab, A. M. Mauer, H. Ashenbrucker, G. E. Cartwright, and M. M. Wintrobe. 1961. Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. *J Clin Invest* 40:989-995.
13. Auffray, C., D. Fogg, M. Garfa, G. Elain, O. Join-Lambert, S. Kayal, S. Sarnacki, A. Cumano, G. Lauvau, and F. Geissmann. 2007. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317:666-670.
14. Bae, S., T. Kang, J. Hong, S. Lee, J. Choi, H. Jhun, A. Kwak, K. Hong, E. Kim, S. Jo, and S. Kim. 2012. Contradictory functions (activation/termination) of neutrophil proteinase 3 enzyme (PR3) in interleukin-33 biological activity. *J Biol Chem* 287:8205-8213.

15. Balasubramanian, K., J. Chandra, and A. J. Schroit. 1997. Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes. The role of beta2-glycoprotein I in macrophage recognition. *J Biol Chem* 272:31113-31117.
16. Balogh, I., S. Hafizi, J. Stenhoff, K. Hansson, and B. Dahlback. 2005. Analysis of Gas6 in human platelets and plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1280-1286.
17. Banerjee, S., A. Friggeri, G. Liu, and E. Abraham. 2010. The C-terminal acidic tail is responsible for the inhibitory effects of HMGB1 on efferocytosis. *J Leukoc Biol* 88:973-979.
18. Bastos-Amador, P., B. Perez-Cabezas, N. Izquierdo-Useros, M. C. Puertas, J. Martinez-Picado, R. Pujol-Borrell, M. Naranjo-Gomez, and F. E. Borrás. 2012. Capture of cell-derived microvesicles (exosomes and apoptotic bodies) by human plasmacytoid dendritic cells. *J Leukoc Biol* 91:751-758.
19. Bauer, S., M. Abdgawad, L. Gunnarsson, M. Segelmark, H. Tapper, and T. Hellmark. 2007. Proteinase 3 and CD177 are expressed on the plasma membrane of the same subset of neutrophils. *J Leukoc Biol* 81:458-464.
20. Belaaouaj, A., R. McCarthy, M. Baumann, Z. Gao, T. J. Ley, S. N. Abraham, and S. D. Shapiro. 1998. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat Med* 4:615-618.
21. Bellingan, G. J., H. Caldwell, S. E. Howie, I. Dransfield, and C. Haslett. 1996. In vivo fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes. *J Immunol* 157:2577-2585.
22. Benson, K. F., F. Q. Li, R. E. Person, D. Albani, Z. Duan, J. Wechsler, K. Meade-White, K. Williams, G. M. Acland, G. Niemeyer, C. D. Lothrop, and M. Horwitz. 2003. Mutations associated with neutropenia in dogs and humans disrupt intracellular transport of neutrophil elastase. *Nat Genet* 35:90-96.
23. Berahovich, R. D., Z. Miao, Y. Wang, B. Premack, M. C. Howard, and T. J. Schall. 2005. Proteolytic activation of alternative CCR1 ligands in inflammation. *J Immunol* 174:7341-7351.
24. Bergenfeldt, M., L. Axelsson, and K. Ohlsson. 1992. Release of neutrophil proteinase 4(3) and leukocyte elastase during phagocytosis and their interaction with proteinase inhibitors. *Scand J Clin Lab Invest* 52:823-829.
25. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.
26. Bianchi, M. E. 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81:1-5.
28. Bonnefoy, F., S. Perruche, M. Couturier, A. Sedrati, Y. Sun, P. Tiberghien, B. Gaugler, and P. Saas. 2011a. Plasmacytoid dendritic cells play a major role in apoptotic leukocyte-induced immune modulation. *J Immunol* 186:5696-5705.
27. Bonnefoy, F., M. Couturier, A. Clauzon, J. P. Remy-Martin, B. Gaugler, P. Tiberghien, W. Chen, P. Saas, and S. Perruche. 2011b. TGF-beta-exposed plasmacytoid dendritic cells participate in Th17 commitment. *J Immunol* 186:6157-6164.
29. Bories, D., M. C. Raynal, D. H. Solomon, Z. Darzynkiewicz, and Y. E. Cayre. 1989. Down-regulation of a serine protease, myeloblastin, causes growth arrest and differentiation of promyelocytic leukemia cells. *Cell* 59:959-968.

30. Borisenko, G. G., T. Matsura, S. X. Liu, V. A. Tyurin, J. Jianfei, F. B. Serinkan, and V. E. Kagan. 2003. Macrophage recognition of externalized phosphatidylserine and phagocytosis of apoptotic Jurkat cells--existence of a threshold. *Arch Biochem Biophys* 413:41-52.
31. Borregaard, N., and J. B. Cowland. 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89:3503-3521.
32. Bouayad, D., M. Pederzoli-Ribeil, J. Mocek, C. Candalh, J. B. Arlet, O. Hermine, N. Reuter, N. Davezac, and V. Witko-Sarsat. 2012. Nuclear-to-cytoplasmic relocation of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) during differentiation involves a chromosome region maintenance 1 (CRM1)-dependent export and is a prerequisite for PCNA antiapoptotic activity in mature neutrophils. *J Biol Chem* 287:33812-33825.
33. Bournazou, I., J. D. Pound, R. Duffin, S. Bournazos, L. A. Melville, S. B. Brown, A. G. Rossi, and C. D. Gregory. 2009. Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin. *J Clin Invest* 119:20-32.
34. Braun, M. G., E. Csernok, W. L. Gross, and H. K. Muller-Hermelink. 1991. Proteinase 3, the target antigen of anticytoplasmic antibodies circulating in Wegener's granulomatosis. Immunolocalization in normal and pathologic tissues. *Am J Pathol* 139:831-838.
35. Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532-1535.
36. Brown, G. C., and J. J. Neher. 2012. Eaten alive! Cell death by primary phagocytosis: 'phagoptosis'. *Trends Biochem Sci* 37:325-332.
37. Brown, S., I. Heinisch, E. Ross, K. Shaw, C. D. Buckley, and J. Savill. 2002. Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature* 418:200-203.
38. Byrne, A., and D. J. Reen. 2002. Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J Immunol* 168:1968-1977.
39. Bystrom, J., I. Evans, J. Newson, M. Stables, I. Toor, N. van Rooijen, M. Crawford, P. Colville-Nash, S. Farrow, and D. W. Gilroy. 2008. Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood* 112:4117-4127.
40. Capraru, D., A. Muller, E. Csernok, W. L. Gross, K. Holl-Ulrich, J. Northfield, P. Klennerman, K. Herlyn, J. Holle, S. Gottschlich, J. Voswinkel, T. Spies, U. Fagin, W. J. Jabs, and P. Lamprecht. 2008. Expansion of circulating NKG2D+ effector memory T-cells and expression of NKG2D-ligand MIC in granulomatous lesions in Wegener's granulomatosis. *Clin Immunol* 127:144-150.
41. Cash, J. L., A. R. Christian, and D. R. Greaves. 2010. Chemerin peptides promote phagocytosis in a ChemR23- and Syk-dependent manner. *J Immunol* 184:5315-5324.
42. Cash, J. L., R. Hart, A. Russ, J. P. Dixon, W. H. Colledge, J. Doran, A. G. Hendrick, M. B. Carlton, and D. R. Greaves. 2008. Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23. *J Exp Med* 205:767-775.
43. Caughey, G. H., T. H. Schaumberg, E. H. Zerweck, J. H. Butterfield, R. D. Hanson, G. A. Silverman, and T. J. Ley. 1993. The human mast cell chymase gene (CMA1): mapping to the cathepsin G/granzyme gene cluster and lineage-restricted expression. *Genomics* 15:614-620.
44. Cezanne, L., A. Lopez, F. Loste, G. Parnaud, O. Saurel, P. Demange, and J. F. Tocanne. 1999. Organization and dynamics of the proteolipid complexes formed by annexin V and lipids in planar supported lipid bilayers. *Biochemistry* 38:2779-2786.
45. Cheadle, C., A. E. Berger, F. Andrade, R. James, K. Johnson, T. Watkins, J. K. Park, Y. C. Chen, E. Ehrlich, M. Mullins, F. Chrest, K. C. Barnes, and S. M. Levine. 2010. Transcription of

- proteinase 3 and related myelopoiesis genes in peripheral blood mononuclear cells of patients with active Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 62:1744-1754.
46. Chekeni, F. B., M. R. Elliott, J. K. Sandilos, S. F. Walk, J. M. Kinchen, E. R. Lazarowski, A. J. Armstrong, S. Penuela, D. W. Laird, G. S. Salvesen, B. E. Isakson, D. A. Bayliss, and K. S. Ravichandran. 2010. Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* 467:863-867.
 47. Chen, G. Y., and G. Nunez. 2010. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 10:826-837.
 48. Chen, G. Y., J. Tang, P. Zheng, and Y. Liu. 2009. CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses. *Science* 323:1722-1725.
 49. Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198:1875-1886.
 50. Chen, W., X. Liang, A. J. Peterson, D. H. Munn, and B. R. Blazar. 2008. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol* 181:5396-5404.
 51. Chen, Y., R. Corriden, Y. Inoue, L. Yip, N. Hashiguchi, A. Zinkernagel, V. Nizet, P. A. Insel, and W. G. Junger. 2006. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* 314:1792-1795.
 52. Chertov, O., H. Ueda, L. L. Xu, K. Tani, W. J. Murphy, J. M. Wang, O. M. Howard, T. J. Sayers, and J. J. Oppenheim. 1997. Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. *J Exp Med* 186:739-747.
 53. Chertov, O., H. Ueda, L. L. Xu, K. Tani, W. J. Murphy, J. M. Wang, O. M. Howard, T. J. Sayers, and J. J. Oppenheim. 1997. Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. *J Exp Med* 186:739-747.
 54. Chiara, A. D., M. Pederzoli-Ribeil, P. R. Burgel, C. Danel, and V. Witko-Sarsat. 2012. Targeting cytosolic proliferating cell nuclear antigen in neutrophil-dominated inflammation. *Front Immunol* 3:311.
 55. Choi, S. C., V. R. Simhadri, L. Tian, A. Gil-Krzewska, K. Krzewski, F. Borrego, and J. E. Coligan. 2011. Cutting edge: mouse CD300f (CMRF-35-like molecule-1) recognizes outer membrane-exposed phosphatidylserine and can promote phagocytosis. *J Immunol* 187:3483-3487.
 56. Chow, A., D. Lucas, A. Hidalgo, S. Mendez-Ferrer, D. Hashimoto, C. Scheiermann, M. Battista, M. Leboeuf, C. Prophete, N. van Rooijen, M. Tanaka, M. Merad, and P. S. Frenette. 2011. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med* 208:261-271.
 57. Cisse, B., M. L. Caton, M. Lehner, T. Maeda, S. Scheu, R. Locksley, D. Holmberg, C. Zweier, N. S. den Hollander, S. G. Kant, W. Holter, A. Rauch, Y. Zhuang, and B. Reizis. 2008. Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* 135:37-48.
 58. Coeshott, C., C. Ohnemus, A. Pilyavskaya, S. Ross, M. Wieczorek, H. Kroona, A. H. Leimer, and J. Cheronis. 1999. Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6261-6266.

59. Contractor, N., J. Louten, L. Kim, C. A. Biron, and B. L. Kelsall. 2007. Cutting edge: Peyer's patch plasmacytoid dendritic cells (pDCs) produce low levels of type I interferons: possible role for IL-10, TGFbeta, and prostaglandin E2 in conditioning a unique mucosal pDC phenotype. *J Immunol* 179:2690-2694.
60. Conus, S., R. Perozzo, T. Reinheckel, C. Peters, L. Scapozza, S. Yousefi, and H. U. Simon. 2008. Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. *J Exp Med* 205:685-698.
61. Cornish, A. L., I. K. Campbell, B. S. McKenzie, S. Chatfield, and I. P. Wicks. 2009. G-CSF and GM-CSF as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 5:554-559.
62. Coughlin, S. R., and E. Camerer. 2003. PARTicipation in inflammation. *J Clin Invest* 111:25-27.
63. Crozat, K., R. Guiton, M. Guilliams, S. Henri, T. Baranek, I. Schwartz-Cornil, B. Malissen, and M. Dalod. 2010. Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets. *Immunol Rev* 234:177-198.
64. Csernok, E., M. Ai, W. L. Gross, D. Wicklein, A. Petersen, B. Lindner, P. Lamprecht, J. U. Holle, and B. Hellmich. 2006. Wegener autoantigen induces maturation of dendritic cells and licenses them for Th1 priming via the protease-activated receptor-2 pathway. *Blood* 107:4440-4448.
65. D'Alessio, F. R., K. Tsushima, N. R. Aggarwal, E. E. West, M. H. Willett, M. F. Britos, M. R. Pipeling, R. G. Brower, R. M. Tuder, J. F. McDyer, and L. S. King. 2009. CD4+CD25+Foxp3+ Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury. *J Clin Invest* 119:2898-2913.
66. David, A., R. Fridlich, and I. Aviram. 2005. The presence of membrane Proteinase 3 in neutrophil lipid rafts and its colocalization with FcgammaRIIIb and cytochrome b558. *Exp Cell Res* 308:156-165.
67. David, A., Y. Kacher, U. Specks, and I. Aviram. 2003. Interaction of proteinase 3 with CD11b/CD18 (beta2 integrin) on the cell membrane of human neutrophils. *J Leukoc Biol* 74:551-557.
68. De, Y., Q. Chen, A. P. Schmidt, G. M. Anderson, J. M. Wang, J. Wooters, J. J. Oppenheim, and O. Chertov. 2000. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med* 192:1069-1074.
69. Dean, R. A., J. H. Cox, C. L. Bellac, A. Doucet, A. E. Starr, and C. M. Overall. 2008. Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR+ CXC chemokines and generates CCL2, -7, -8, and -13 antagonists: potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx. *Blood* 112:3455-3464.
70. Devitt, A., and L. J. Marshall. 2011. The innate immune system and the clearance of apoptotic cells. *J Leukoc Biol* 90:447-457.
71. Dolman, K. M., C. A. Stegeman, B. A. van de Wiel, C. E. Hack, A. E. von dem Borne, C. G. Kallenberg, and R. Goldschmeding. 1993. Relevance of classic anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody (C-ANCA)-mediated inhibition of proteinase 3-alpha 1-antitrypsin complexation to disease activity in Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Immunol* 93:405-410.
72. Dostert, C., V. Petrilli, R. Van Bruggen, C. Steele, B. T. Mossman, and J. Tschopp. 2008. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320:674-677.

73. Dublet, B., A. Ruello, M. Pederzoli, E. Hajjar, M. Courbebaisse, S. Canteloup, N. Reuter, and V. Witko-Sarsat. 2005. Cleavage of p21/WAF1/CIP1 by proteinase 3 modulates differentiation of a monocytic cell line. Molecular analysis of the cleavage site. *J Biol Chem* 280:30242-30253.
74. Duhon, T., R. Geiger, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2009. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 10:857-863.
75. Durant, S., M. Pederzoli, Y. Lepelletier, S. Canteloup, P. Nusbaum, P. Lesavre, and V. Witko-Sarsat. 2004. Apoptosis-induced proteinase 3 membrane expression is independent from degranulation. *J Leukoc Biol* 75:87-98.
76. Edwards, J. R., and G. R. Mundy. 2011. Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models. *Nat Rev Rheumatol* 7:235-243.
77. El Kebir, D., P. Gjorstrup, and J. G. Filep. 2012. Resolvin E1 promotes phagocytosis-induced neutrophil apoptosis and accelerates resolution of pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:14983-14988.
78. Elliott, M. R., F. B. Chekeni, P. C. Trampont, E. R. Lazarowski, A. Kadl, S. F. Walk, D. Park, R. I. Woodson, M. Ostankovich, P. Sharma, J. J. Lysiak, T. K. Harden, N. Leitinger, and K. S. Ravichandran. 2009. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461:282-286.
79. Elliott, M. R., and K. S. Ravichandran. 2010. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol* 189:1059-1070.
80. Ezekowitz, R. A., K. Sastry, P. Bailly, and A. Warner. 1990. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med* 172:1785-1794.
81. Fadeel, B., P. Quinn, D. Xue, and V. Kagan. 2007. Fat(al) attraction: oxidized lipids act as "eat-me" signals. *Hfsp J* 1:225-229.
82. Fadok, V. A., D. L. Bratton, S. C. Frasch, M. L. Warner, and P. M. Henson. 1998a. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 5:551-562.
83. Fadok, V. A., D. L. Bratton, A. Konowal, P. W. Freed, J. Y. Westcott, and P. M. Henson. 1998b. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101:890-898.
84. Feng, X., T. Deng, Y. Zhang, S. Su, C. Wei, and D. Han. 2011. Lipopolysaccharide inhibits macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils by regulating the production of tumour necrosis factor alpha and growth arrest-specific gene 6. *Immunology* 132:287-295.
85. Fernandez-Boyanapalli, R., K. A. McPhillips, S. C. Frasch, W. J. Janssen, M. C. Dinauer, D. W. Riches, P. M. Henson, A. Byrne, and D. L. Bratton. 2010. Impaired phagocytosis of apoptotic cells by macrophages in chronic granulomatous disease is reversed by IFN-gamma in a nitric oxide-dependent manner. *J Immunol* 185:4030-4041.
86. Fernandez-Boyanapalli, R. F., S. C. Frasch, K. McPhillips, R. W. Vandivier, B. L. Harry, D. W. Riches, P. M. Henson, and D. L. Bratton. 2009. Impaired apoptotic cell clearance in CGD due to altered macrophage programming is reversed by phosphatidylserine-dependent production of IL-4. *Blood* 113:2047-2055.

87. Florey, O., and D. O. Haskard. 2009. Sphingosine 1-phosphate enhances Fc gamma receptor-mediated neutrophil activation and recruitment under flow conditions. *J Immunol* 183:2330-2336.
88. Flory, C. M., M. L. Jones, and J. S. Warren. 1993. Pulmonary granuloma formation in the rat is partially dependent on monocyte chemoattractant protein 1. *Lab Invest* 69:396-404.
89. Foxman, E. F., J. J. Campbell, and E. C. Butcher. 1997. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol* 139:1349-1360.
90. Francis, N., S. H. Wong, P. Hampson, K. Wang, S. P. Young, H. P. Deigner, M. Salmon, D. Scheel-Toellner, and J. M. Lord. 2011. Lactoferrin inhibits neutrophil apoptosis via blockade of proximal apoptotic signaling events. *Biochim Biophys Acta* 1813:1822-1826.
91. Frasch, S. C., R. F. Fernandez-Boyanapalli, K. A. Berry, R. C. Murphy, C. C. Leslie, J. A. Nick, P. M. Henson, and D. L. Bratton. 2013. Neutrophils regulate tissue Neutrophilia in inflammation via the oxidant-modified lipid lysophosphatidylserine. *J Biol Chem* 288:4583-4593.
92. Frasch, S. C., R. F. Fernandez-Boyanapalli, K. Z. Berry, C. C. Leslie, J. V. Bonventre, R. C. Murphy, P. M. Henson, and D. L. Bratton. 2011. Signaling via macrophage G2A enhances efferocytosis of dying neutrophils by augmentation of Rac activity. *J Biol Chem* 286:12108-12122.
93. Freire-de-Lima, C. G., Y. Q. Xiao, S. J. Gardai, D. L. Bratton, W. P. Schiemann, and P. M. Henson. 2006. Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. *J Biol Chem* 281:38376-38384.
94. Frey, B., L. E. Munoz, F. Pausch, R. Sieber, S. Franz, B. Brachvogel, E. Poschl, H. Schneider, F. Rodel, R. Sauer, R. Fietkau, M. Herrmann, and U. S. Gaipl. 2009. The immune reaction against allogeneic necrotic cells is reduced in Annexin A5 knock out mice whose macrophages display an anti-inflammatory phenotype. *J Cell Mol Med* 13:1391-1399.
95. Fridlich, R., A. David, and I. Aviram. 2006. Membrane proteinase 3 and its interactions within microdomains of neutrophil membranes. *J Cell Biochem* 99:117-125.
96. Fuchs, T. A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176:231-241.
97. Funamoto, S., R. Meili, S. Lee, L. Parry, and R. A. Firtel. 2002. Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell* 109:611-623.
98. Furze, R. C., and S. M. Rankin. 2008. The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. *Faseb J* 22:3111-3119.
99. Gardai, S. J., K. A. McPhillips, S. C. Frasch, W. J. Janssen, A. Starefeldt, J. E. Murphy-Ullrich, D. L. Bratton, P. A. Oldenborg, M. Michalak, and P. M. Henson. 2005. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123:321-334.
100. Gardiner, D. M., P. Waring, and B. J. Howlett. 2005. The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology* 151:1021-1032.
101. Garwicz, D., A. Lennartsson, S. E. Jacobsen, U. Gullberg, and A. Lindmark. 2005. Biosynthetic profiles of neutrophil serine proteases in a human bone marrow-derived cellular myeloid differentiation model. *Haematologica* 90:38-44.

102. Garwicz, D., A. Lindmark, T. Hellmark, M. Gladh, J. Jogi, and U. Gullberg. 1997. Characterization of the processing and granular targeting of human proteinase 3 after transfection to the rat RBL or the murine 32D leukemic cell lines. *J Leukoc Biol* 61:113-123.
103. Garwicz, D., A. Lindmark, A. M. Persson, and U. Gullberg. 1998. On the role of the proform-conformation for processing and intracellular sorting of human cathepsin G. *Blood* 92:1415-1422.
104. Gautier, E. L., S. Ivanov, P. Lesnik, and G. J. Randolph. 2013. Local apoptosis mediates clearance of macrophages from resolving inflammation in mice. *Blood* 122:2714-2722.
105. Geering, B., and H. U. Simon. 2011a. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ* 18:1457-1469.
106. Geering, B., U. Gurzeler, E. Federzoni, T. Kaufmann, and H. U. Simon. 2011b. A novel TNFR1-triggered apoptosis pathway mediated by class IA PI3Ks in neutrophils. *Blood* 117:5953-5962.
107. Geering, B., J. Schmidt-Mende, E. Federzoni, C. Stoeckle, and H. U. Simon. 2011c. Protein overexpression following lentiviral infection of primary mature neutrophils is due to pseudotransduction. *J Immunol Methods* 373:209-218.
108. Geering, B., C. Stoeckle, S. Conus, and H. U. Simon. 2013. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends Immunol* 34:398-409.
109. Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad, and K. Ley. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327:656-661.
110. Gerszten, R. E., E. A. Garcia-Zepeda, Y. C. Lim, M. Yoshida, H. A. Ding, M. A. Gimbrone, Jr., A. D. Luster, F. W. Luscinskas, and A. Rosenzweig. 1999. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 398:718-723.
111. Ghosn, E. E., A. A. Cassado, G. R. Govoni, T. Fukuhara, Y. Yang, D. M. Monack, K. R. Bortoluci, S. R. Almeida, L. A. Herzenberg, and L. A. Herzenberg. 2010. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2568-2573.
112. Ginhoux, F., M. Greter, M. Leboeuf, S. Nandi, P. See, S. Gokhan, M. F. Mehler, S. J. Conway, L. G. Ng, E. R. Stanley, I. M. Samokhvalov, and M. Merad. 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330:841-845.
113. Goldmann, W. H., J. L. Niles, and M. A. Arnaout. 1999. Interaction of purified human proteinase 3 (PR3) with reconstituted lipid bilayers. *Eur J Biochem* 261:155-162.
114. Golpon, H. A., V. A. Fadok, L. Taraseviciene-Stewart, R. Scerbavicius, C. Sauer, T. Welte, P. M. Henson, and N. F. Voelkel. 2004. Life after corpse engulfment: phagocytosis of apoptotic cells leads to VEGF secretion and cell growth. *Faseb J* 18:1716-1718.
115. Green, D. 2011. Means to an end. Apoptosis and other cell death mechanisms. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
116. Green, D. R., T. Ferguson, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2009. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol* 9:353-363.
117. Gregory, C. D., A. Devitt, and O. Moffatt. 1998. Roles of ICAM-3 and CD14 in the recognition and phagocytosis of apoptotic cells by macrophages. *Biochem Soc Trans* 26:644-649.
118. Gude, D. R., S. E. Alvarez, S. W. Paugh, P. Mitra, J. Yu, R. Griffiths, S. E. Barbour, S. Milstien, and S. Spiegel. 2008. Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal. *Faseb J* 22:2629-2638.

119. Hadeiba, H., K. Lahl, A. Edalati, C. Oderup, A. Habtezion, R. Pachynski, L. Nguyen, A. Ghodsi, S. Adler, and E. C. Butcher. 2012. Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity* 36:438-450.
120. Hajjar, E. 2007. Molecular modeling of the substrate specificity and of the membrane anchoring of proteinase 3. *PhD dissertation* University of Bergen, Norway.
121. Hajjar, E., T. Broemstrup, C. Kantari, V. Witko-Sarsat, and N. Reuter. 2010. Structures of human proteinase 3 and neutrophil elastase--so similar yet so different. *FEBS J* 277:2238-2254.
122. Hajjar, E., M. Mihajlovic, V. Witko-Sarsat, T. Lazaridis, and N. Reuter. 2008. Computational prediction of the binding site of proteinase 3 to the plasma membrane. *Proteins* 71:1655-1669.
123. Halbwachs-Mecarelli, L., G. Bessou, P. Lesavre, S. Lopez, and V. Witko-Sarsat. 1995. Bimodal distribution of proteinase 3 (PR3) surface expression reflects a constitutive heterogeneity in the polymorphonuclear neutrophil pool. *FEBS Lett* 374:29-33.
124. Han, C. Z., and K. S. Ravichandran. 2011. Metabolic connections during apoptotic cell engulfment. *Cell* 147:1442-1445.
125. Han, J., C. Q. Zhong, and D. W. Zhang. 2011. Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nat Immunol* 12:1143-1149.
126. Hanabuchi, S., T. Ito, W. R. Park, N. Watanabe, J. L. Shaw, E. Roman, K. Arima, Y. H. Wang, K. S. Voo, W. Cao, and Y. J. Liu. 2010. Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus. *J Immunol* 184:2999-3007.
127. Hanayama, R., M. Tanaka, K. Miyasaka, K. Aozasa, M. Koike, Y. Uchiyama, and S. Nagata. 2004. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science* 304:1147-1150.
128. Hashimoto, D., A. Chow, C. Noizat, P. Teo, M. B. Beasley, M. Leboeuf, C. D. Becker, P. See, J. Price, D. Lucas, M. Greter, A. Mortha, S. W. Boyer, E. C. Forsberg, M. Tanaka, N. van Rooijen, A. Garcia-Sastre, E. R. Stanley, F. Ginhoux, P. S. Frenette, and M. Merad. 2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38:792-804.
129. Hashimoto, D., J. Miller, and M. Merad. 2011. Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo. *Immunity* 35:323-335.
130. He, M., H. Kubo, K. Morimoto, N. Fujino, T. Suzuki, T. Takahashi, M. Yamada, M. Yamaya, T. Maekawa, Y. Yamamoto, and H. Yamamoto. 2011. Receptor for advanced glycation end products binds to phosphatidylserine and assists in the clearance of apoptotic cells. *EMBO Rep* 12:358-364.
131. Henson, P. M., and D. A. Hume. 2006. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunol* 27:244-250.
132. Hepper, I., J. Schymeinsky, L. T. Weckbach, S. M. Jakob, D. Frommhold, M. Sixt, M. Laschinger, M. Sperandio, and B. Walzog. 2012. The mammalian actin-binding protein 1 is critical for spreading and intraluminal crawling of neutrophils under flow conditions. *J Immunol* 188:4590-4601.
133. Hernandez Perez, J. M., S. Fumero Garcia, and A. Alvarez Pio. 2013. Successful alpha1-antitrypsin replacement therapy in a patient with alpha1-antitrypsin deficiency and granulomatosis with polyangiitis. *Rheumatology (Oxford)* 52:755-757.

134. Hochreiter-Hufford, A., and K. S. Ravichandran. 2013. Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:a008748.
135. Hristov, M., S. Schmitz, F. Nauwelaers, and C. Weber. 2012. A flow cytometric protocol for enumeration of endothelial progenitor cells and monocyte subsets in human blood. *J Immunol Methods* 381:9-13.
136. Huang, F. P., N. Platt, M. Wykes, J. R. Major, T. J. Powell, C. D. Jenkins, and G. G. MacPherson. 2000. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* 191:435-444.
137. Huang, J. T., J. S. Welch, M. Ricote, C. J. Binder, T. M. Willson, C. Kelly, J. L. Witztum, C. D. Funk, D. Conrad, and C. K. Glass. 1999. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 400:378-382.
138. Hurst, S. M., T. S. Wilkinson, R. M. McLoughlin, S. Jones, S. Horiuchi, N. Yamamoto, S. Rose-John, G. M. Fuller, N. Topley, and S. A. Jones. 2001. Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 14:705-714.
139. Huynh, M. L., V. A. Fadok, and P. M. Henson. 2002. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* 109:41-50.
140. Iannaccone, M., E. A. Moseman, E. Tonti, L. Bosurgi, T. Junt, S. E. Henrickson, S. P. Whelan, L. G. Guidotti, and U. H. von Andrian. 2010. Subcapsular sinus macrophages prevent CNS invasion on peripheral infection with a neurotropic virus. *Nature* 465:1079-1083.
141. Ingersoll, M. A., A. M. Platt, S. Potteaux, and G. J. Randolph. 2011. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol* 32:470-477.
142. Ito, T., R. Amakawa, M. Inaba, T. Hori, M. Ota, K. Nakamura, M. Takebayashi, M. Miyaji, T. Yoshimura, K. Inaba, and S. Fukuhara. 2004. Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J Immunol* 172:4253-4259.
143. Jaiswal, S., M. P. Chao, R. Majeti, and I. L. Weissman. 2010. Macrophages as mediators of tumor immunosurveillance. *Trends Immunol* 31:212-219.
144. Jenkins, S. J., D. Ruckerl, P. C. Cook, L. H. Jones, F. D. Finkelman, N. van Rooijen, A. S. MacDonald, and J. E. Allen. 2011. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* 332:1284-1288.
145. Jiang, B., E. Grage-Griebenow, E. Csernok, K. Butherus, S. Ehlers, W. L. Gross, and J. U. Holle. 2010. The role of proteinase 3 (PR3) and the protease-activated receptor-2 (PAR-2) pathway in dendritic cell (DC) maturation of human-DC-like monocytes and murine DC. *Clin Exp Rheumatol* 28:56-61.
146. Jiang, D., J. Liang, J. Fan, S. Yu, S. Chen, Y. Luo, G. D. Prestwich, M. M. Mascarenhas, H. G. Garg, D. A. Quinn, R. J. Homer, D. R. Goldstein, R. Bucala, P. J. Lee, R. Medzhitov, and P. W. Noble. 2005. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med* 11:1173-1179.
147. Johnson, H. G., and M. K. Bach. 1975. Prevention of calcium ionophore-induced release of histamine in rat mast cells by disodium cromoglycate. *J Immunol* 114:514-516.
148. Jones, M. L., and J. S. Warren. 1992. Monocyte chemoattractant protein 1 in a rat model of pulmonary granulomatosis. *Lab Invest* 66:498-503.

149. Just, J., C. Moog-Lutz, A. Houzel-Charavel, S. Canteloup, A. Grimfeld, V. Witko-Sarsat, and Y. E. Cayre. 1999. Proteinase 3 mRNA expression is induced in monocytes but not in neutrophils of patients with cystic fibrosis. *FEBS Lett* 457:437-440.
150. Kang, K., S. M. Reilly, V. Karabacak, M. R. Gangl, K. Fitzgerald, B. Hatano, and C. H. Lee. 2008. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab* 7:485-495.
151. Kantari, C., M. Pederzoli-Ribeil, O. Amir-Moazami, V. Gausson-Dorey, I. C. Moura, M. C. Lecomte, M. Benhamou, and V. Witko-Sarsat. 2007. Proteinase 3, the Wegener autoantigen, is externalized during neutrophil apoptosis: evidence for a functional association with phospholipid scramblase 1 and interference with macrophage phagocytosis. *Blood* 110:4086-4095.
152. Kao, R. C., N. G. Wehner, K. M. Skubitz, B. H. Gray, and J. R. Hoidal. 1988. Proteinase 3. A distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters. *J Clin Invest* 82:1963-1973.
153. Kawane, K., M. Ohtani, K. Miwa, T. Kizawa, Y. Kanbara, Y. Yoshioka, H. Yoshikawa, and S. Nagata. 2006. Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature* 443:998-1002.
154. Keller, M., A. Ruegg, S. Werner, and H. D. Beer. 2008. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 132:818-831.
155. Kenis, H., H. van Genderen, N. M. Deckers, P. A. Lux, L. Hofstra, J. Narula, and C. P. Reutelingsperger. 2006. Annexin A5 inhibits engulfment through internalization of PS-expressing cell membrane patches. *Exp Cell Res* 312:719-726.
156. Kessenbrock, K., L. Frohlich, M. Sixt, T. Lammermann, H. Pfister, A. Bateman, A. Belaaouaj, J. Ring, M. Ollert, R. Fassler, and D. E. Jenne. 2008. Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating antiinflammatory progranulin. *J Clin Invest* 118:2438-2447.
157. Khokha, R., A. Murthy, and A. Weiss. 2013. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 13:649-665.
158. Kierdorf, K., and G. Fritz. 2013. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *J Leukoc Biol* 94:55-68.
159. Kim, S., K. B. Elkon, and X. Ma. 2004. Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity* 21:643-653.
160. Kim, S. J., D. Gershov, X. Ma, N. Brot, and K. B. Elkon. 2002. I-PLA(2) activation during apoptosis promotes the exposure of membrane lysophosphatidylcholine leading to binding by natural immunoglobulin M antibodies and complement activation. *J Exp Med* 196:655-665.
161. Kinchen, J. M., and M. O. Hengartner. 2005. Tales of cannibalism, suicide, and murder: Programmed cell death in *C. elegans*. *Curr Top Dev Biol* 65:1-45.
162. Kiss, R. S., M. R. Elliott, Z. Ma, Y. L. Marcel, and K. S. Ravichandran. 2006. Apoptotic cells induce a phosphatidylserine-dependent homeostatic response from phagocytes. *Curr Biol* 16:2252-2258.
163. Kohyama, M., W. Ise, B. T. Edelson, P. R. Wilker, K. Hildner, C. Mejia, W. A. Frazier, T. L. Murphy, and K. M. Murphy. 2009. Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature* 457:318-321.

164. Kolaczowska, E., W. Grzybek, N. van Rooijen, H. Piccard, B. Plytycz, B. Arnold, and G. Opdenakker. 2009. Neutrophil elastase activity compensates for a genetic lack of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in leukocyte infiltration in a model of experimental peritonitis. *J Leukoc Biol* 85:374-381.
165. Kolaczowska, E., and P. Kubes. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13:159-175.
166. Komura, H., M. Miksa, R. Wu, S. M. Goyert, and P. Wang. 2009. Milk fat globule epidermal growth factor-factor VIII is down-regulated in sepsis via the lipopolysaccharide-CD14 pathway. *J Immunol* 182:581-587.
167. Krausgruber, T., K. Blazek, T. Smallie, S. Alzabin, H. Lockstone, N. Sahgal, T. Hussell, M. Feldmann, and I. A. Udalova. 2011. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* 12:231-238.
168. Krautgartner, W. D., M. Klappacher, M. Hannig, A. Obermayer, D. Hartl, V. Marcos, and L. Vitkov. 2010. Fibrin mimics neutrophil extracellular traps in SEM. *Ultrastruct Pathol* 34:226-231.
169. Kress, H., E. H. Stelzer, D. Holzer, F. Buss, G. Griffiths, and A. Rohrbach. 2007. Filopodia act as phagocytic tentacles and pull with discrete steps and a load-dependent velocity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:11633-11638.
170. Kuckleburg, C. J., S. B. Tilkens, S. Santoso, and P. J. Newman. 2012. Proteinase 3 contributes to transendothelial migration of NB1-positive neutrophils. *J Immunol* 188:2419-2426.
171. Kulms, D., and T. Schwarz. 2000. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 16:195-201.
172. Labbaye, C., J. Zhang, J. L. Casanova, M. Lanotte, J. Teng, W. H. Miller, Jr., and Y. E. Cayre. 1993. Regulation of myeloblastin messenger RNA expression in myeloid leukemia cells treated with all-trans retinoic acid. *Blood* 81:475-481.
173. Landsman, L., and S. Jung. 2007. Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 179:3488-3494.
174. Lauber, K., E. Bohn, S. M. Krober, Y. J. Xiao, S. G. Blumenthal, R. K. Lindemann, P. Marini, C. Wiedig, A. Zobywalski, S. Baksh, Y. Xu, I. B. Autenrieth, K. Schulze-Osthoff, C. Belka, G. Stuhler, and S. Wesselborg. 2003. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 113:717-730.
175. Lawrence, T., and G. Natoli. 2011. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* 11:750-761.
176. Le Buanec, H., M. L. Gougeon, A. Mathian, P. Lebon, J. M. Dupont, G. Peltre, P. Hemon, M. Schmid, B. Bizzini, T. Kunding, A. Burny, A. Bensussan, Z. Amoura, R. C. Gallo, and D. Zagury. 2011. IFN-alpha and CD46 stimulation are associated with active lupus and skew natural T regulatory cell differentiation to type 1 regulatory T (Tr1) cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:18995-19000.
177. Leid, R. W., B. E. Ballieux, I. van der Heijden, C. Kleyburg-van der Keur, E. C. Hagen, L. A. van Es, F. J. van der Woude, and M. R. Daha. 1993. Cleavage and inactivation of human C1 inhibitor by the human leukocyte proteinase, proteinase 3. *Eur J Immunol* 23:2939-2944.
178. Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7:678-689.
179. Li, K. W., S. M. Turner, C. L. Emson, M. K. Hellerstein, and D. C. Dale. 2011. Deuterium and neutrophil kinetics. *Blood* 117:6052-6053; author reply 6053-6054.

180. Li, P., M. Li, M. R. Lindberg, M. J. Kennett, N. Xiong, and Y. Wang. 2010. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* 207:1853-1862.
181. Liu, X., B. Ma, A. B. Malik, H. Tang, T. Yang, B. Sun, G. Wang, R. D. Minshall, Y. Li, Y. Zhao, R. D. Ye, and J. Xu. 2012. Bidirectional regulation of neutrophil migration by mitogen-activated protein kinases. *Nat Immunol* 13:457-464.
182. Lloberas, J., and A. Celada. 2009. p21(waf1/CIP1), a CDK inhibitor and a negative feedback system that controls macrophage activation. *Eur J Immunol* 39:691-694.
183. Lucas, T., A. Waisman, R. Ranjan, J. Roes, T. Krieg, W. Muller, A. Roers, and S. A. Eming. 2010. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol* 184:3964-3977.
184. Lui, G., O. Manches, J. Angel, J. P. Molens, L. Chaperot, and J. Plumas. 2009. Plasmacytoid dendritic cells capture and cross-present viral antigens from influenza-virus exposed cells. *PLoS One* 4:e7111.
185. Lutz, P. G., A. Houzel-Charavel, C. Moog-Lutz, and Y. E. Cayre. 2001. Myeloblastin is an Myb target gene: mechanisms of regulation in myeloid leukemia cells growth-arrested by retinoic acid. *Blood* 97:2449-2456.
186. Lutz, P. G., C. Moog-Lutz, E. Coumau-Gatbois, L. Kobari, Y. Di Gioia, and Y. E. Cayre. 2000. Myeloblastin is a granulocyte colony-stimulating factor-responsive gene conferring factor-independent growth to hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1601-1606.
187. Mahr, A. D., J. C. Edberg, J. H. Stone, G. S. Hoffman, E. W. St Clair, U. Specks, P. F. Dellaripa, P. Seo, R. F. Spiera, F. N. Rouhani, M. L. Brantly, and P. A. Merkel. 2010. Alpha(1)-antitrypsin deficiency-related alleles Z and S and the risk of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 62:3760-3767.
188. Mak, T., and M. Saunders. 2004. The Immune Response. Basic abd clinical principles. . Academic Press.
189. Mariathasan, S., K. Newton, D. M. Monack, D. Vucic, D. M. French, W. P. Lee, M. Roose-Girma, S. Erickson, and V. M. Dixit. 2004. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430:213-218.
190. Martinez, F. O., A. Sica, A. Mantovani, and M. Locati. 2008. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13:453-461.
191. Marwick, J. A., D. A. Dorward, C. D. Lucas, K. O. Jones, T. A. Sheldrake, S. Fox, C. Ward, J. Murray, M. Brittan, N. Hirani, R. Duffin, I. Dransfield, C. Haslett, and A. G. Rossi. 2013. Oxygen levels determine the ability of glucocorticoids to influence neutrophil survival in inflammatory environments. *J Leukoc Biol*.
192. Massena, S., G. Christoffersson, E. Hjertstrom, E. Zcharia, I. Vlodavsky, N. Ausmees, C. Rolny, J. P. Li, and M. Phillipson. 2010. A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils. *Blood* 116:1924-1931.
193. Mauer, A. M., J. W. Athens, H. Ashenbrucker, G. E. Cartwright, and M. M. Wintrobe. 1960. Leukokinetic Studies. Ii. a Method for Labeling Granulocytes in Vitro with Radioactive Diisopropylfluorophosphate (Dfp). *J Clin Invest* 39:1481-1486.
194. McQuibban, G. A., J. H. Gong, J. P. Wong, J. L. Wallace, I. Clark-Lewis, and C. M. Overall. 2002. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* 100:1160-1167.

195. Meagher, L. C., J. M. Cousin, J. R. Seckl, and C. Haslett. 1996. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *J Immunol* 156:4422-4428.
196. Medzhitov, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449:819-826.
197. Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454:428-435.
198. Medzhitov, R., and C. A. Janeway, Jr. 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91:295-298.
199. Menegazzi, R., E. Decleva, and P. Dri. 2012. Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? *Blood* 119:1214-1216.
200. Michlewska, S., I. Dransfield, I. L. Megson, and A. G. Rossi. 2009. Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is critically regulated by the opposing actions of pro-inflammatory and anti-inflammatory agents: key role for TNF-alpha. *Faseb J* 23:844-854.
201. Miksa, M., D. Amin, R. Wu, T. S. Ravikumar, and P. Wang. 2007. Fractalkine-induced MFG-E8 leads to enhanced apoptotic cell clearance by macrophages. *Mol Med* 13:553-560.
202. Miles, K., D. J. Clarke, W. Lu, Z. Sibinska, P. E. Beaumont, D. J. Davidson, T. A. Barr, D. J. Campopiano, and M. Gray. 2009. Dying and necrotic neutrophils are anti-inflammatory secondary to the release of alpha-defensins. *J Immunol* 183:2122-2132.
203. Miles, K., J. Heaney, Z. Sibinska, D. Salter, J. Savill, D. Gray, and M. Gray. 2012. A tolerogenic role for Toll-like receptor 9 is revealed by B-cell interaction with DNA complexes expressed on apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:887-892.
204. Misharin, A. V., R. Saber, and H. Perlman. 2012. Eosinophil contamination of thioglycollate-elicited peritoneal macrophage cultures skews the functional readouts of in vitro assays. *J Leukoc Biol* 92:325-331.
205. Miyake, Y., K. Asano, H. Kaise, M. Uemura, M. Nakayama, and M. Tanaka. 2007. Critical role of macrophages in the marginal zone in the suppression of immune responses to apoptotic cell-associated antigens. *J Clin Invest* 117:2268-2278.
206. Miyanishi, M., K. Tada, M. Koike, Y. Uchiyama, T. Kitamura, and S. Nagata. 2007. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 450:435-439.
207. Morelli, A. E., A. T. Larregina, W. J. Shufesky, A. F. Zahorchak, A. J. Logar, G. D. Papworth, Z. Wang, S. C. Watkins, L. D. Falo, Jr., and A. W. Thomson. 2003. Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* 101:611-620.
208. Mosser, D. M., and J. P. Edwards. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8:958-969.
209. Mukundan, L., J. I. Odegaard, C. R. Morel, J. E. Heredia, J. W. Mwangi, R. R. Ricardo-Gonzalez, Y. P. Goh, A. R. Eagle, S. E. Dunn, J. U. Awakuni, K. D. Nguyen, L. Steinman, S. A. Michie, and A. Chawla. 2009. PPAR-delta senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance. *Nat Med* 15:1266-1272.
210. Mulgrew-Nesbitt, A., K. Diraviyam, J. Wang, S. Singh, P. Murray, Z. Li, L. Rogers, N. Mirkovic, and D. Murray. 2006. The role of electrostatics in protein-membrane interactions. *Biochim Biophys Acta* 1761:812-826.
211. Muller Kobold, A. C., C. G. Kallenberg, and J. W. Tervaert. 1999. Monocyte activation in patients with Wegener's granulomatosis. *Ann Rheum Dis* 58:237-245.

212. Murphy, B. M., A. J. O'Neill, C. Adrain, R. W. Watson, and S. J. Martin. 2003. The apoptosome pathway to caspase activation in primary human neutrophils exhibits dramatically reduced requirements for cytochrome C. *J Exp Med* 197:625-632.
213. Nagata, S., R. Hanayama, and K. Kawane. 2010. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* 140:619-630.
214. Nathan, C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature* 420:846-852.
215. Nathan, C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6:173-182.
216. Nauseef, W. M. 2012. Editorial: Nyet to NETs? A pause for healthy skepticism. *J Leukoc Biol* 91:353-355.
217. Novick, D., M. Rubinstein, T. Azam, A. Rabinkov, C. A. Dinarello, and S. H. Kim. 2006. Proteinase 3 is an IL-32 binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3316-3321.
218. Obeid, M., T. Panaretakis, N. Joza, R. Tufi, A. Tesniere, P. van Endert, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2007a. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 14:1848-1850.
219. Obeid, M., A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G. M. Fimia, L. Apetoh, J. L. Perfettini, M. Castedo, G. Mignot, T. Panaretakis, N. Casares, D. Metivier, N. Larochette, P. van Endert, F. Ciccosanti, M. Piacentini, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2007b. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13:54-61.
220. Ogden, C. A., A. deCathelineau, P. R. Hoffmann, D. Bratton, B. Ghebrehiwet, V. A. Fadok, and P. M. Henson. 2001. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med* 194:781-795.
221. Ohlsson, S., T. Hellmark, K. Pieters, G. Sturfelt, J. Wieslander, and M. Segelmark. 2005. Increased monocyte transcription of the proteinase 3 gene in small vessel vasculitis. *Clin Exp Immunol* 141:174-182.
222. Ohlsson, S. M., A. Pettersson, S. Ohlsson, D. Selga, A. A. Bengtsson, M. Segelmark, and T. Hellmark. 2012. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 170:47-56.
223. Owen, C. A., M. A. Campbell, P. L. Sannes, S. S. Boukedes, and E. J. Campbell. 1995. Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *J Cell Biol* 131:775-789.
224. Padrines, M., M. Wolf, A. Walz, and M. Baggiolini. 1994. Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3. *FEBS Lett* 352:231-235.
225. Pahlman, L. I., M. Morgelin, J. Eckert, L. Johansson, W. Russell, K. Riesbeck, O. Soehnlein, L. Lindbom, A. Norrby-Teglund, R. R. Schumann, L. Bjorck, and H. Herwald. 2006. Streptococcal M protein: a multipotent and powerful inducer of inflammation. *J Immunol* 177:1221-1228.
226. Papayannopoulos, V., K. D. Metzler, A. Hakkim, and A. Zychlinsky. 2010. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 191:677-691.
227. Park, D., C. Z. Han, M. R. Elliott, J. M. Kinchen, P. C. Trampont, S. Das, S. Collins, J. J. Lysiak, K. L. Hoehn, and K. S. Ravichandran. 2011. Continued clearance of apoptotic cells critically depends on the phagocyte Ucp2 protein. *Nature* 477:220-224.

228. Park, D., A. Hochreiter-Hufford, and K. S. Ravichandran. 2009. The phosphatidylserine receptor TIM-4 does not mediate direct signaling. *Curr Biol* 19:346-351.
229. Park, D., A. C. Tosello-Tramont, M. R. Elliott, M. Lu, L. B. Haney, Z. Ma, A. L. Klibanov, J. W. Mandell, and K. S. Ravichandran. 2007. BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature* 450:430-434.
230. Park, S. Y., M. Y. Jung, H. J. Kim, S. J. Lee, S. Y. Kim, B. H. Lee, T. H. Kwon, R. W. Park, and I. S. Kim. 2008. Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell Death Differ* 15:192-201.
231. Parnai, R., M. C. Raff, and J. Scholes. 2000. Differences between the clearance of apoptotic cells by professional and non-professional phagocytes. *Curr Biol* 10:857-860.
232. Parsons, S. A., R. Sharma, D. L. Roccamatysi, H. Zhang, B. Petri, P. Kubes, P. Colarusso, and K. D. Patel. 2012. Endothelial paxillin and focal adhesion kinase (FAK) play a critical role in neutrophil transmigration. *Eur J Immunol* 42:436-446.
233. Parwaresch, M. R., and H. H. Wacker. 1984. Origin and kinetics of resident tissue macrophages. Parabiosis studies with radiolabelled leucocytes. *Cell Tissue Kinet* 17:25-39.
234. Passante, E., and N. Frankish. 2009. The RBL-2H3 cell line: its provenance and suitability as a model for the mast cell. *Inflamm Res* 58:737-745.
235. Passlick, B., D. Flieger, and H. W. Ziegler-Heitbrock. 1989. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74:2527-2534.
236. Perretti, M., J. D. Croxtall, S. K. Wheller, N. J. Goulding, R. Hannon, and R. J. Flower. 1996. Mobilizing lipocortin 1 in adherent human leukocytes downregulates their transmigration. *Nat Med* 2:1259-1262.
237. Perretti, M., and E. Solito. 2004. Annexin 1 and neutrophil apoptosis. *Biochem Soc Trans* 32:507-510.
238. Perruche, S., P. Zhang, Y. Liu, P. Saas, J. A. Bluestone, and W. Chen. 2008. CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor-beta from phagocytes digesting apoptotic T cells. *Nat Med* 14:528-535.
239. Peschel, A., and D. Hartl. 2012. Anuclear neutrophils keep hunting. *Nat Med* 18:1336-1338.
240. Pham, C. T. 2006. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol* 6:541-550.
241. Phillipson, M., B. Heit, P. Colarusso, L. Liu, C. M. Ballantyne, and P. Kubes. 2006. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med* 203:2569-2575.
242. Phillipson, M., J. Kaur, P. Colarusso, C. M. Ballantyne, and P. Kubes. 2008. Endothelial domes encapsulate adherent neutrophils and minimize increases in vascular permeability in paracellular and transcellular emigration. *PLoS One* 3:e1649.
243. Pillay, J., I. den Braber, N. Vrisekoop, L. M. Kwast, R. J. de Boer, J. A. Borghans, K. Tesselaar, and L. Koenderman. 2010. In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116:625-627.
244. Piqueras, B., J. Connolly, H. Freitas, A. K. Palucka, and J. Banchereau. 2006. Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. *Blood* 107:2613-2618.
245. Pisetsky, D. S., A. J. Ullal, J. Gauley, and T. C. Ning. 2012. Microparticles as mediators and biomarkers of rheumatic disease. *Rheumatology (Oxford)* 51:1737-1746.

246. Pourcet, B., J. E. Feig, Y. Vengrenyuk, A. J. Hobbs, D. Kepka-Lenhart, M. J. Garabedian, S. M. Morris, Jr., E. A. Fisher, and I. Pineda-Torra. 2011. LXRalpha regulates macrophage arginase 1 through PU.1 and interferon regulatory factor 8. *Circ Res* 109:492-501.
247. Pyonteck, S. M., L. Akkari, A. J. Schuhmacher, R. L. Bowman, L. Sevenich, D. F. Quail, O. C. Olson, M. L. Quick, J. T. Huse, V. Teijeiro, M. Setty, C. S. Leslie, Y. Oei, A. Pedraza, J. Zhang, C. W. Brennan, J. C. Sutton, E. C. Holland, D. Daniel, and J. A. Joyce. 2013. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med* 19:1264-1272.
248. Qian, B. Z., J. Li, H. Zhang, T. Kitamura, J. Zhang, L. R. Campion, E. A. Kaiser, L. A. Snyder, and J. W. Pollard. 2011. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 475:222-225.
249. Rajakariar, R., T. Lawrence, J. Bystrom, M. Hilliard, P. Colville-Nash, G. Bellingan, D. Fitzgerald, M. M. Yaqoob, and D. W. Gilroy. 2008. Novel biphasic role for lymphocytes revealed during resolving inflammation. *Blood* 111:4184-4192.
250. Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg, and R. Medzhitov. 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118:229-241.
251. Ralston, D. R., C. B. Marsh, M. P. Lowe, and M. D. Wewers. 1997. Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce monocyte IL-8 release. Role of surface proteinase-3, alpha1-antitrypsin, and Fcgamma receptors. *J Clin Invest* 100:1416-1424.
252. Ramachandran, V., M. Williams, T. Yago, D. W. Schmidtke, and R. P. McEver. 2004. Dynamic alterations of membrane tethers stabilize leukocyte rolling on P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13519-13524.
253. Rao, N. V., N. G. Wehner, B. C. Marshall, W. R. Gray, B. H. Gray, and J. R. Hoidal. 1991. Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structural and functional properties. *J Biol Chem* 266:9540-9548.
254. Ravichandran, K. S. 2010. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *J Exp Med* 207:1807-1817.
255. Ravichandran, K. S., and U. Lorenz. 2007. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol* 7:964-974.
256. Reeves, E. P., H. Lu, H. L. Jacobs, C. G. Messina, S. Bolsover, G. Gabella, E. O. Potma, A. Warley, J. Roes, and A. W. Segal. 2002. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* 416:291-297.
257. Reizis, B., A. Bunin, H. S. Ghosh, K. L. Lewis, and V. Sisirak. 2011. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol* 29:163-183.
258. Renesto, P., L. Halbwachs-Mecarelli, P. Nusbaum, P. Lesavre, and M. Chignard. 1994. Proteinase 3. A neutrophil proteinase with activity on platelets. *J Immunol* 152:4612-4617.
259. Rey-Giraud, F., M. Hafner, and C. H. Ries. 2012. In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS One* 7:e42656.
260. Richardson, R. M., H. Ali, E. D. Tomhave, B. Haribabu, and R. Snyderman. 1995. Cross-desensitization of chemoattractant receptors occurs at multiple levels. Evidence for a role for inhibition of phospholipase C activity. *J Biol Chem* 270:27829-27833.
261. Ricklin, D., G. Hajishengallis, K. Yang, and J. D. Lambris. 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 11:785-797.

262. Robbins, C. S., I. Hilgendorf, G. F. Weber, I. Theurl, Y. Iwamoto, J. L. Figueiredo, R. Gorbatov, G. K. Sukhova, L. M. Gerhardt, D. Smyth, C. C. Zavitz, E. A. Shikatani, M. Parsons, N. van Rooijen, H. Y. Lin, M. Husain, P. Libby, M. Nahrendorf, R. Weissleder, and F. K. Swirski. 2013. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med* 19:1166-1172.
263. Ross, E. A., M. R. Douglas, S. H. Wong, E. J. Ross, S. J. Curnow, G. B. Nash, E. Rainger, D. Scheel-Toellner, J. M. Lord, M. Salmon, and C. D. Buckley. 2006. Interaction between integrin $\alpha 9 \beta 1$ and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) inhibits neutrophil apoptosis. *Blood* 107:1178-1183.
264. Saas, P., S. Kaminski, and S. Perruche. 2013. Prospects of apoptotic cell-based therapies for transplantation and inflammatory diseases. *Immunotherapy* 5:1055-1073.
265. Saclier, M., H. Yacoub-Youssef, A. L. Mackey, L. Arnold, H. Ardjoune, M. Magnan, F. Sailhan, J. Chelly, G. K. Pavlath, R. Mounier, M. Kjaer, and B. Chazaud. 2013. Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. *Stem Cells* 31:384-396.
266. Sathe, P., D. Vremec, L. Wu, L. Corcoran, and K. Shortman. 2013. Convergent differentiation: myeloid and lymphoid pathways to murine plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 121:11-19.
267. Savill, J., I. Dransfield, N. Hogg, and C. Haslett. 1990. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 343:170-173.
268. Savill, J., N. Hogg, and C. Haslett. 1991. Macrophage vitronectin receptor, CD36, and thrombospondin cooperate in recognition of neutrophils undergoing programmed cell death. *Chest* 99:6S-7S.
269. Scannell, M., M. B. Flanagan, A. deStefani, K. J. Wynne, G. Cagney, C. Godson, and P. Maderna. 2007. Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. *J Immunol* 178:4595-4605.
270. Scatizzi, J. C., M. Mavers, J. Hutcheson, B. Young, B. Shi, R. M. Pope, E. M. Ruderman, D. S. Samways, J. A. Corbett, T. M. Egan, and H. Perlman. 2009. The CDK domain of p21 is a suppressor of IL-1 β -mediated inflammation in activated macrophages. *Eur J Immunol* 39:820-825.
271. Schif-Zuck, S., N. Gross, S. Assi, R. Rostoker, C. N. Serhan, and A. Ariel. 2011. Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b low macrophages: modulation by resolvins and glucocorticoids. *Eur J Immunol* 41:366-379.
272. Schmitz, J., A. Owyang, E. Oldham, Y. Song, E. Murphy, T. K. McClanahan, G. Zurawski, M. Moshrefi, J. Qin, X. Li, D. M. Gorman, J. F. Bazan, and R. A. Kastelein. 2005. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23:479-490.
273. Schreiber, A., A. Busjahn, F. C. Luft, and R. Kettritz. 2003. Membrane expression of proteinase 3 is genetically determined. *J Am Soc Nephrol* 14:68-75.
274. Schulz, C., E. Gomez Perdiguero, L. Chorro, H. Szabo-Rogers, N. Cagnard, K. Kierdorf, M. Prinz, B. Wu, S. E. Jacobsen, J. W. Pollard, J. Frampton, K. J. Liu, and F. Geissmann. 2012. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336:86-90.
275. Scott, R. S., E. J. McMahon, S. M. Pop, E. A. Reap, R. Caricchio, P. L. Cohen, H. S. Earp, and G. K. Matsushima. 2001. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 411:207-211.

276. Semerad, C. L., F. Liu, A. D. Gregory, K. Stumpf, and D. C. Link. 2002. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity* 17:413-423.
277. Serafini, P., S. Mgebroff, K. Noonan, and I. Borrello. 2008. Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res* 68:5439-5449.
278. Serhan, C. N. 2010. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? *Am J Pathol* 177:1576-1591.
279. Serhan, C. N., N. Chiang, and T. E. Van Dyke. 2008. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* 8:349-361.
280. Serhan, C. N., R. Yang, K. Martinod, K. Kasuga, P. S. Pillai, T. F. Porter, S. F. Oh, and M. Spite. 2009. Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *J Exp Med* 206:15-23.
281. Shi, C., and E. G. Pamer. 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 11:762-774.
282. Sica, A., and A. Mantovani. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122:787-795.
283. Siegal, F. P., N. Kadowaki, M. Shodell, P. A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko, and Y. J. Liu. 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284:1835-1837.
284. Silva, M. T. 2010. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J Leukoc Biol* 87:93-106.
285. Silverman, E. K., and R. A. Sandhaus. 2009. Clinical practice. Alpha1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med* 360:2749-2757.
286. Simhadri, V. R., J. F. Andersen, E. Calvo, S. C. Choi, J. E. Coligan, and F. Borrego. 2012. Human CD300a binds to phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine, and modulates the phagocytosis of dead cells. *Blood* 119:2799-2809.
287. Skold, S., B. Rosberg, U. Gullberg, and T. Olofsson. 1999. A secreted proform of neutrophil proteinase 3 regulates the proliferation of granulopoietic progenitor cells. *Blood* 93:849-856.
288. Soehnlein, O., and L. Lindbom. 2009. Neutrophil-derived azurocidin alarms the immune system. *J Leukoc Biol* 85:344-351.
289. Soehnlein, O., and L. Lindbom. 2010. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 10:427-439.
290. Soehnlein, O., A. Zernecke, E. E. Eriksson, A. G. Rothfuchs, C. T. Pham, H. Herwald, K. Bidzhekov, M. E. Rottenberg, C. Weber, and L. Lindbom. 2008. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood* 112:1461-1471.
291. Stables, M. J., S. Shah, E. B. Camon, R. C. Lovering, J. Newson, J. Bystrom, S. Farrow, and D. W. Gilroy. 2011. Transcriptomic analyses of murine resolution-phase macrophages. *Blood* 118:e192-208.
292. Stark, K., A. Eckart, S. Haidari, A. Tirniceriu, M. Lorenz, M. L. von Bruhl, F. Gartner, A. G. Khandoga, K. R. Legate, R. Pless, I. Hepper, K. Lauber, B. Walzog, and S. Massberg. 2013. Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs. *Nat Immunol* 14:41-51.

293. Stark, M. A., Y. Huo, T. L. Burcin, M. A. Morris, T. S. Olson, and K. Ley. 2005. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 22:285-294.
294. Steppich, B. A., I. Seitz, G. Busch, A. Stein, and I. Ott. 2008. Modulation of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor-1 by neutrophil proteases. *Thromb Haemost* 100:1068-1075.
295. Stroncek, D. F., K. M. Skubitz, and J. J. McCullough. 1990. Biochemical characterization of the neutrophil-specific antigen NB1. *Blood* 75:744-755.
296. Stuart, L. M., M. Lucas, C. Simpson, J. Lamb, J. Savill, and A. Lacy-Hulbert. 2002. Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. *J Immunol* 168:1627-1635.
297. Summers, C., S. M. Rankin, A. M. Condliffe, N. Singh, A. M. Peters, and E. R. Chilvers. 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* 31:318-324.
298. Sundd, P., E. Gutierrez, E. K. Koltsova, Y. Kuwano, S. Fukuda, M. K. Pospieszalska, A. Groisman, and K. Ley. 2012. 'Slings' enable neutrophil rolling at high shear. *Nature* 488:399-403.
299. Sundd, P., E. Gutierrez, M. K. Pospieszalska, H. Zhang, A. Groisman, and K. Ley. 2010. Quantitative dynamic footprinting microscopy reveals mechanisms of neutrophil rolling. *Nat Methods* 7:821-824.
300. Suzuki, J., M. Umeda, P. J. Sims, and S. Nagata. 2010. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* 468:834-838.
301. Taekema-Roelvink, M. E., C. Kooten, S. V. Kooij, E. Heemskerk, and M. R. Daha. 2001. Proteinase 3 enhances endothelial monocyte chemoattractant protein-1 production and induces increased adhesion of neutrophils to endothelial cells by upregulating intercellular cell adhesion molecule-1. *J Am Soc Nephrol* 12:932-940.
302. Tager, A. M., and A. D. Luster. 2003. BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69:123-134.
303. Tak, T., K. Tesselaar, J. Pillay, J. A. Borghans, and L. Koenderman. 2013. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J Leukoc Biol* 94:595-601.
304. Takahashi, K., F. Yamamura, and M. Naito. 1989. Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *J Leukoc Biol* 45:87-96.
305. Takeuchi, O., and S. Akira. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140:805-820.
306. Tian, J., A. M. Avalos, S. Y. Mao, B. Chen, K. Senthil, H. Wu, P. Parroche, S. Drabic, D. Golenbock, C. Sirois, J. Hua, L. L. An, L. Audoly, G. La Rosa, A. Bierhaus, P. Naworth, A. Marshak-Rothstein, M. K. Crow, K. A. Fitzgerald, E. Latz, P. A. Kiener, and A. J. Coyle. 2007. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 8:487-496.
307. Truman, L. A., C. A. Ford, M. Pasikowska, J. D. Pound, S. J. Wilkinson, I. E. Dumitriu, L. Melville, L. A. Melrose, C. A. Ogden, R. Nibbs, G. Graham, C. Combadiere, and C. D. Gregory. 2008. CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood* 112:5026-5036.
308. Tsai, R. K., and D. E. Discher. 2008. Inhibition of "self" engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells. *J Cell Biol* 180:989-1003.

309. Turer, E. E., R. M. Tavares, E. Mortier, O. Hitotsumatsu, R. Advincula, B. Lee, N. Shifrin, B. A. Malynn, and A. Ma. 2008. Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20. *J Exp Med* 205:451-464.
310. Tyurin, V. A., Y. Y. Tyurina, P. M. Kochanek, R. Hamilton, S. T. DeKosky, J. S. Greenberger, H. Bayir, and V. E. Kagan. 2008. Oxidative lipidomics of programmed cell death. *Methods Enzymol* 442:375-393.
311. Uderhardt, S., M. Herrmann, O. V. Oskolkova, S. Aschermann, W. Bicker, N. Ipseiz, K. Sarter, B. Frey, T. Rothe, R. Voll, F. Nimmerjahn, V. N. Bochkov, G. Schett, and G. Kronke. 2012. 12/15-lipoxygenase orchestrates the clearance of apoptotic cells and maintains immunologic tolerance. *Immunity* 36:834-846.
312. Van den Steen, P. E., P. Proost, A. Wuyts, J. Van Damme, and G. Opdenakker. 2000. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 96:2673-2681.
313. van der Geld, Y. M., P. C. Limburg, and C. G. Kallenberg. 2001. Proteinase 3, Wegener's autoantigen: from gene to antigen. *J Leukoc Biol* 69:177-190.
314. van Furth, R., and Z. A. Cohn. 1968. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 128:415-435.
315. van Rossum, A. P., M. G. Huitema, C. A. Stegeman, M. Bijl, K. de Leeuw, M. A. Van Leeuwen, P. C. Limburg, and C. G. Kallenberg. 2007. Standardised assessment of membrane proteinase 3 expression. Analysis in ANCA-associated vasculitis and controls. *Ann Rheum Dis* 66:1350-1355.
316. Verbovetski, I., H. Bychkov, U. Trahtenberg, I. Shapira, M. Hareuveni, O. Ben-Tal, I. Kutikov, O. Gill, and D. Mevorach. 2002. Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7. *J Exp Med* 196:1553-1561.
317. Villadangos, J. A., and L. Young. 2008. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 29:352-361.
318. Vissers, M. C., P. M. George, I. C. Bathurst, S. O. Brennan, and C. C. Winterbourn. 1988. Cleavage and inactivation of alpha 1-antitrypsin by metalloproteinases released from neutrophils. *J Clin Invest* 82:706-711.
319. Voll, R. E., M. Herrmann, E. A. Roth, C. Stach, J. R. Kalden, and I. Girkontaite. 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390:350-351.
320. von Vietinghoff, S., G. Tunnemann, C. Eulenberg, M. Wellner, M. Cristina Cardoso, F. C. Luft, and R. Kettritz. 2007. NB1 mediates surface expression of the ANCA antigen proteinase 3 on human neutrophils. *Blood* 109:4487-4493.
321. Wakkach, A., N. Fournier, V. Brun, J. P. Breittmayer, F. Cottrez, and H. Groux. 2003. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18:605-617.
322. Wang, Y., Y. P. Wang, G. Zheng, V. W. Lee, L. Ouyang, D. H. Chang, D. Mahajan, J. Coombs, Y. M. Wang, S. I. Alexander, and D. C. Harris. 2007. Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease. *Kidney Int* 72:290-299.
323. Watson, F., J. J. Robinson, and S. W. Edwards. 1992. Neutrophil function in whole blood and after purification: changes in receptor expression, oxidase activity and responsiveness to cytokines. *Biosci Rep* 12:123-133.

324. Weiss, S. J. 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320:365-376.
325. Welch, J. S., M. Ricote, T. E. Akiyama, F. J. Gonzalez, and C. K. Glass. 2003. PPARgamma and PPARdelta negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN-gamma target genes in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6712-6717.
326. Wiedow, O., J. Luademann, and B. Utecht. 1991. Elafin is a potent inhibitor of proteinase 3. *Biochem Biophys Res Commun* 174:6-10.
327. Wiesner, O., R. D. Litwiller, A. M. Hummel, M. A. Viss, C. J. McDonald, D. E. Jenne, D. N. Fass, and U. Specks. 2005. Differences between human proteinase 3 and neutrophil elastase and their murine homologues are relevant for murine model experiments. *FEBS Lett* 579:5305-5312.
328. Wiggs, B. R., D. English, W. M. Quinlan, N. A. Doyle, J. C. Hogg, and C. M. Doerschuk. 1994. Contributions of capillary pathway size and neutrophil deformability to neutrophil transit through rabbit lungs. *J Appl Physiol (1985)* 77:463-470.
329. Witko-Sarsat, V., S. Canteloup, S. Durant, C. Desdouets, R. Chabernaude, P. Lemarchand, and B. Descamps-Latscha. 2002. Cleavage of p21waf1 by proteinase-3, a myeloid-specific serine protease, potentiates cell proliferation. *J Biol Chem* 277:47338-47347.
330. Witko-Sarsat, V., S. Canteloup, V. Gausson, P. Lemarchand, and C. Danel. 2007. In vivo Adenovirus-mediated gene transfer in rats, provided evidence of a pro-inflammatory role of human proteinase 3 and the expression of pro-inflammatory cytokines. *Clin Exp Immunol* 25:S92. Abstract.
331. Witko-Sarsat, V., E. M. Cramer, C. Hieblot, J. Guichard, P. Nusbaum, S. Lopez, P. Lesavre, and L. Halbwachs-Mecarelli. 1999a. Presence of proteinase 3 in secretory vesicles: evidence of a novel, highly mobilizable intracellular pool distinct from azurophil granules. *Blood* 94:2487-2496.
332. Witko-Sarsat, V., P. Lesavre, S. Lopez, G. Bessou, C. Hieblot, B. Prum, L. H. Noel, L. Guillevin, P. Ravaud, I. Sermet-Gaudelus, J. Timsit, J. P. Grunfeld, and L. Halbwachs-Mecarelli. 1999b. A large subset of neutrophils expressing membrane proteinase 3 is a risk factor for vasculitis and rheumatoid arthritis. *J Am Soc Nephrol* 10:1224-1233.
333. Witko-Sarsat, V., J. Mocek, D. Bouayad, N. Tamassia, J. A. Ribeil, C. Candalh, N. Davezac, N. Reuter, L. Mouthon, O. Hermine, M. Pederzoli-Ribeil, and M. A. Cassatella. 2010a. Proliferating cell nuclear antigen acts as a cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival. *J Exp Med* 207:2631-2645.
334. Witko-Sarsat, V., N. Reuter, and L. Mouthon. 2010b. Interaction of proteinase 3 with its associated partners: implications in the pathogenesis of Wegener's granulomatosis. *Curr Opin Rheumatol* 22:1-7.
335. Witko-Sarsat, V., M. Pederzoli-Ribeil, E. Hirsch, S. Sozzani, and M. A. Cassatella. 2011. Regulating neutrophil apoptosis: new players enter the game. *Trends Immunol* 32:117-124.
336. Wittamer, V., J. D. Franssen, M. Vulcano, J. F. Mirjolet, E. Le Poul, I. Migeotte, S. Brezillon, R. Tyldesley, C. Blanpain, M. Detheux, A. Mantovani, S. Sozzani, G. Vassart, M. Parmentier, and D. Communi. 2003. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med* 198:977-985.
337. Wong, K. L., W. H. Yeap, J. J. Tai, S. M. Ong, T. M. Dang, and S. C. Wong. 2012. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res* 53:41-57.

338. Wong, S. H., N. Francis, H. Chahal, K. Raza, M. Salmon, D. Scheel-Toellner, and J. M. Lord. 2009. Lactoferrin is a survival factor for neutrophils in rheumatoid synovial fluid. *Rheumatology (Oxford)* 48:39-44.
339. Woodfin, A., M. B. Voisin, M. Beyrau, B. Colom, D. Caille, F. M. Diapouli, G. B. Nash, T. Chavakis, S. M. Albelda, G. E. Rainger, P. Meda, B. A. Imhof, and S. Nourshargh. 2011. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nat Immunol* 12:761-769.
340. Yamamoto, S., S. Shimizu, S. Kiyonaka, N. Takahashi, T. Wajima, Y. Hara, T. Negoro, T. Hiroi, Y. Kiuchi, T. Okada, S. Kaneko, I. Lange, A. Fleig, R. Penner, M. Nishi, H. Takeshima, and Y. Mori. 2008. TRPM2-mediated Ca²⁺-influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat Med* 14:738-747.
341. Yanai, H., T. Ban, Z. Wang, M. K. Choi, T. Kawamura, H. Negishi, M. Nakasato, Y. Lu, S. Hangai, R. Koshiba, D. Savitsky, L. Ronfani, S. Akira, M. E. Bianchi, K. Honda, T. Tamura, T. Kodama, and T. Taniguchi. 2009. HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature* 462:99-103.
342. Yipp, B. G., B. Petri, D. Salina, C. N. Jenne, B. N. Scott, L. D. Zbytnuik, K. Pittman, M. Asaduzzaman, K. Wu, H. C. Meijndert, S. E. Malawista, A. de Boisleury Chevance, K. Zhang, J. Conly, and P. Kubes. 2012. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med* 18:1386-1393.
343. Yousefi, S., C. Mihalache, E. Kozlowski, I. Schmid, and H. U. Simon. 2009. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ* 16:1438-1444.
344. Zagursky, R. J., D. Sharp, K. A. Solomon, and A. Schwartz. 1995. Quantitation of cellular receptors by a new immunocytochemical flow cytometry technique. *Biotechniques* 18:504-509.
345. Zanoni, I., R. Ostuni, L. R. Marek, S. Barresi, R. Barbalat, G. M. Barton, F. Granucci, and J. C. Kagan. 2011. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell* 147:868-880.
346. Zarbock, A., K. Ley, R. P. McEver, and A. Hidalgo. 2011. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* 118:6743-6751.
347. Zimmer, M., R. L. Medcalf, T. M. Fink, C. Mattmann, P. Lichter, and D. E. Jenne. 1992. Three human elastase-like genes coordinately expressed in the myelomonocyte lineage are organized as a single genetic locus on 19pter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8215-8219.
348. Zlotnik, A., and O. Yoshie. 2012. The chemokine superfamily revisited. *Immunity* 36:705-716.

ABSTRACT

Granulomatosis with polyangiitis is a systemic vasculitides associated with an autoimmune response directed against proteinase 3 a neutrophil-derived serine protease. This protein presents a very specific pattern of expression in neutrophils, illustrated by its membrane expression during apoptosis. The ability of PR3 to bind membrane is based on the existence of four amino-acids involved in the formation of an hydrophobic patch. The membrane expression during apoptosis, which is dependent of the existence of the hydrophobic patch, leads to an interaction between proteinase 3 and calreticulin, a “eat-me” signal involved in the recognition of apoptotic cells by macrophages. As a consequence, we have found that proteinase 3 expressed at the surface of apoptotic cells hampers the normal anti-inflammatory phenotype of macrophages following phagocytosis of apoptotic cells. The pro-inflammatory phenotype resulting from proteinase 3 expressing cells phagocytosis by macrophages is a MyD88 signaling pathway dependant mechanism mimicking an alarmin stimulation. This activation of macrophages through the secretion of chemokines (MCP-1, KC, MIP-1 α and MIP-1 β) implicated in the recruitment of cells expressing proteinase 3 participate in the maintenance of inflammation. This macrophage-induced microenvironment was also found to impact the immune silencing of apoptotic cells clearance by plasmacytoid dendritic cell-dependant T cell interaction leading to a skewed Th2/Th9 T cell distribution instead of the generation of regulatory T cells. Proteinase 3, which is encoded by a G-CSF responsive gene, was also able to recruit more over expressing proteinase 3 cells by its ability to stimulate G-CSF secretion. Then proteinase 3 through its corruption of inflammation resolving mechanisms and its self-induced over expression appears to be a central key in the physiopathology of granulomatosis with polyangiitis.

RESUME

La granulomatose avec polyangéite est une vascularite systémique associée à une réaction auto-immune dirigée contre la protéinase 3, une serine protéase du neutrophile. Cette protéine présente un profil particulier d'expression dans le neutrophile, caractérisé notamment par une expression membranaire au cours de l'apoptose. Cette capacité de la protéinase 3 à se lier aux membranes repose sur l'existence de quatre acides aminés formant un patch hydrophobe. Cette expression membranaire au cours de l'apoptose, qui dépend de l'existence de ce patch hydrophobe, conduit la protéinase 3 à interagir avec la calréticuline qui est une molécule impliquée dans la reconnaissance des cellules apoptotiques par les macrophages. Nous avons démontré que cette interaction conduit la protéinase 3 à modifier le phénotype pro-résolutif des macrophages consécutif à la phagocytose de cellules apoptotiques. Le phénotype pro-inflammatoire résultant de cette expression de la protéinase 3 dépend de la voie de signalisation MyD88 mimant un signal danger. Cette activation des macrophages conduit à la sécrétion de chimiokines (MCP-1, KC, MIP-1 α et MIP-1 β) impliquées dans le recrutement de cellules exprimant la protéinase 3 participant ainsi au maintien de l'inflammation. Ce microenvironnement induit par les macrophages modifie le rôle immuno-modulateur de la clairance des cellules apoptotiques, influençant notamment l'interaction des cellules T naïves avec les cellules dendritiques plasmacytoïdes. La polarisation T résultante présente une distribution déséquilibrée vers les lymphocytes Th2/Th9 et une diminution de la génération de lymphocytes T régulateurs. La protéinase 3, qui est encodée par un gène de réponse au G-CSF, est de plus capable d'induire le recrutement de cellules sur-exprimant cette protéase capable à son tour de stimuler la sécrétion de G-CSF. La protéinase 3 apparaît donc, par sa capacité à corrompre les mécanismes de résolution de l'inflammation et d'amplifier sa propre expression dans les cellules recrutées sur le site inflammatoire, comme un élément clé de la physiopathologie de la granulomatose avec polyangéite.